

Hovedfagsoppgave i farmakognosi for graden cand.pharm.

Salvie, *Salvia officinalis* L., som medisinsplante - eksperimentelle studier og litteraturoversikt

Av
Thao Trang Nguyen



Salvia officinalis L.



Avdeling for farmasøytisk kjemi
Fagområde farmakognosi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo, 2007

**Salvie, *S. officinalis*, som medisinsplante
- eksperimentelle studier og litteraturoversikt**

Hovedfagsoppgave i farmakognosi

Utført ved
Avdeling for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
Universitetet i Oslo

Av
Thao Trang Nguyen

Veileder
Professor Karl Egil Malterud

Oslo 2007

FORORD

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til min veileder Karl Egil Malterud for dyktig veiledning, god støtte og et godt samarbeid gjennom hele hovedfagsåret.

Jeg vil også takke mannen min, Thang, for god støtte og oppmuntring gjennom hele studiet og spesielt i dette året.

Til slutt vil jeg takke de ansatte og hovedfagsstudentene på avdelingen for at de har vært hjelpsomme og ellers for et hyggelig hovedfagsår.

Blystadlia, august 2007

Thao Trang Nguyen

INNHold

SAMMENDRAG	1
FORKORTELSER	3
HENSIKT MED OPPGAVEN	5
<u>DEL 1: Antioksidanter i <i>Salvia officinalis</i> L.</u>	6
BAKGRUNN	6
<i>Salvia officinalis</i> L.	6
Frie radikaler	7
• Reaktive oksygenspecier (ROS)	7
• Reaktive nitrogenspecier (RNS)	7
• Dannelse av frie radikaler	7
Antioksidanter	9
• Kroppens antioksidantforsvar	9
• Antioksidanter fra naturen	10
Lipidperoksidering	11
Oksidativt stress	12
Eikosanoider og lipoksygenaser	12
EKSPERIMENTELT	14
Materialer	14
• Kjemikalier	14
• Apparat	14
Metoder	16
Metodeprinsipper	16
• Separasjonsmetoder	16
• Identifikasjonsmetoder	16
• Metoder for måling av biologisk aktivitet	18
Generelle eksperimentelle metoder	20
• Kolonnekromatografi	20
• Tynnsjikt-kromatografi	21
• NMR-spektroskopi	21
• Radikalscavenging	21
• Hemming av 15-lipoksygenase	21
Eksperimentell utførelse	22
• Utgangsmateriale	22
• Diklormetan-ekstraksjoner	22
• Metanol-ekstraksjoner	23
• NMR-spektroskopi	23
• Bioassay	23

• Fraksjonering av diklormetaneekstrakt av økologisk salvie	23
RESULTAT OG DISKUSJON	25
• Diklormetaneekstraktene	25
• Metanolekstraktene	26
• Fraksjonering av diklormetaneekstrakt av økologisk salvie	27
KONKLUSJON	31
LITTERATURLISTE	32
VEDLEGG	35
Vedlegg 1 ¹ H-NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av økologisk salvie	35
Vedlegg 2 ¹³ C-NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av økologisk salvie	35
Vedlegg 3 ¹ H-NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av kryddersalvie "Santa Maria"	36
Vedlegg 4 ¹³ C-NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av kryddersalvie "Santa Maria"	36
Vedlegg 5 ¹ H-NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av kryddersalvie "Jasmin"	37
Vedlegg 6 ¹³ C-NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av kryddersalvie "Jasmin"	37
Vedlegg 7 ¹ H-NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av økologisk salvie	38
Vedlegg 8 ¹³ C-NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av økologisk salvie	38
Vedlegg 9 ¹ H-NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av kryddersalvie "Santa Maria"	39
Vedlegg 10 ¹³ C-NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av kryddersalvie "Santa Maria"	39
Vedlegg 11 ¹ H-NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av kryddersalvie "Jasmin"	40
Vedlegg 12 ¹³ C-NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av kryddersalvie "Jasmin"	40
Vedlegg 13 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 2	41
Vedlegg 14 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 3	41
Vedlegg 15 ¹³ C-NMR-spektrum av fraksjon 3	42
Vedlegg 16 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 4	42
Vedlegg 17 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 5	43
Vedlegg 18 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 6	43
Vedlegg 19 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 7	44
Vedlegg 20 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 8	44

Vedlegg 21 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 9	45
Vedlegg 22 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 10	45
Vedlegg 23 ¹³ C-NMR-spektrum av fraksjon 10	46
Vedlegg 24 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 11	46
Vedlegg 25 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 12	47
Vedlegg 26 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 13	47
Vedlegg 27 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 14	48
Vedlegg 28 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 15	48
Vedlegg 29 ¹³ C-NMR-spektrum av fraksjon 15	49
Vedlegg 30 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 16	49
Vedlegg 31 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 17	50
Vedlegg 32 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 18	50
Vedlegg 33 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 19	51
Vedlegg 34 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 20	51
Vedlegg 35 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 21	52
Vedlegg 36 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 22	52
Vedlegg 37 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 23	53
Vedlegg 38 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 24	53
Vedlegg 39 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 25	54
Vedlegg 40 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 26	54
Vedlegg 41 ¹ H-NMR-spektrum av fraksjon 27	55
Vedlegg 42 Fraksjonering av DCM-ekstrakt av økologisk salvie	56
Vedlegg 43 Radikalscavengeraktivitet for DCM-fraksjonene til økologisk salvie	59
<u>DEL 2: Salvie, <i>Salvia officinalis</i> L., som medisinsplante.</u>	60
INNLEDNING	60
METODE	62
VITENSKAPELIG UNDERSØKELSER	63
Kjemiske innholdsstoffer	63
• Triterpenoider	63
• Apianan terpenoider	63
• Diterpenoider	64
• Fenoliske komponenter	68
• Eterisk olje	77
• Polysakkarider	79
Biologiske/ Farmakologiske aktiviteter	80
• Antioksidantaktivitet	80
• Antiinflammatorisk aktivitet	92

• Antibakterielle og antimikrobielle aktiviteter	94
• Mot Alzheimer	99
• Andre aktiviteter	103
Toksisitet	113
Interaksjoner med andre legemidler	113
Gravide og ammende	113
Produksjon av fenoliske antioksidanter fra <i>in vitro</i> skudd av salvie	114
Faktorer som påvirker den kjemiske sammensetningen til salvie	114
TRADISJONELL BRUK AV <i>S. officinalis</i>	117
KONKLUSJON	119
LITTERATURLISTE	121

Sammendrag

Salvie, *Salvia officinalis* L. er en plante som opprinnelig kommer fra Middelhavsområdet. Den har siden oldtiden blitt anvendt til å kurere mange forskjellige lidelser som halsbetennelse, munnsår, tannkjøttbetennelse, svettetokter, dårlig fordøyelse m.m. Dessuten er planten mye brukt som krydder i mat eller som konserveringsmiddel for å hindre vekst av mikroorganismer og oksidering av fettholdige matvarer. Det er den overjordiske delen av planten, og spesielt bladene som anvendes. Det er antatt at salviens egenskaper blir påvirket av blant annet vekstforholdet. Derfor ble det i den eksperimentelle delen av oppgaven anvendt to salviekrydder av merkene "Santa Maria" og "Jasmin", og en økologisk dyrket salvie.

I den eksperimentelle delen av oppgaven ble den tørkede overjordiske delen til salvie, *S. officinalis*, ekstrahert med diklormetan og deretter med metanol. Utbyttet til diklormetanelekstraktene var for kryddersalvie fra "Santa Maria" og "Jasmin", og økologisk salvie henholdsvis 9.3, 8.7, og 8.7 prosent av plantematerialet. For metanolekstraktene var ekstraktutbyttet til kryddersalvie fra "Santa Maria" og "Jasmin", og økologisk salvie henholdsvis 12.1, 12.2, og 13.1 prosent av plantematerialet.

Diklormetanelekstraktet til økologisk dyrket salvie ble separert, og forbindelser isolert med normalfase kolonnekromatografi. Strukturen til de isolerte forbindelsene ble forsøkt oppklart ved ^1H - og ^{13}C -NMR-spektroskopi. Antioksidantaktivitet ble testet med hensyn til 1,1-difenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)-radikalscavenging, og 15-lipoksygenasehemmende aktivitet ble testet på enzymet 15-LO (15-lipoksygenase) fra soyabønner.

Metanolekstraktene viste høyere aktivitet enn diklormetanelekstraktene i radikalscavenging, mens diklormetanelekstraktene viste seg å være mer aktive som 15-LO-hemmere. Blant metanolekstraktene var økologisk salvie mest aktiv som radikalscavenger med IC_{50} -verdi på $17.9 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$. Den mest aktive 15-LO-hemmer blant diklormetanelekstraktene var kryddersalvie fra "Santa Maria" med IC_{50} -verdi på $33.0 \pm 6 \mu\text{g/ml}$. Fraksjonene til diklormetanelekstraktet til økologisk salvie ble testet på radikalscavenging, og fraksjon 13 viste høyest aktivitet med IC_{50} -verdi på $17.2 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$.

Manool ble isolert fra diklormetanfraksjonen til økologisk salvie og identifisert ut fra NMR-spektra.

Av helsemessige årsaker kunne det eksperimentelle arbeidet med salvie ikke fullføres, derfor ble oppgaven omformulert og gjort om til en litteraturstudie som belyser salviens biologiske og medisinske egenskaper basert på vitenskapelige undersøkelser.

Salvie som er en velkjent krydder- og medisinsplante har blitt relativt godt undersøkt vitenskapelig. Både den kjemiske sammensetningen, biologiske og farmakologiske effekter til salvie har blitt undersøkt i mange studier. Fra en rekke studier er det rapportert at fenoliske forbindelser som rosmarinsyre, carnosol og carnosinsyre er ansvarlige for antioksidantaktiviteten til salvie. Den antimikrobielle aktiviteten til salvie er knyttet til komponentene i den eteriske oljen, og det er mye som tyder på at aktiviteten skyldes synergisme blant komponentene. Salvieekstrakt har vist antiinflammatorisk aktivitet i en rekke studier, og det er antatt at ursolsyre, oleanolsyre, carnosol, carnosinsyre og rosmarinsyre er aktive komponenter. Både den eteriske oljen og ekstraktet til salvie har vist anticholinesterase aktivitet. Antioksidant-, antiinflammatorisk- og anticholinesterase aktivitet er antatt å være relevante i behandling av Alzheimers sykdom. Det har blitt gjort en klinisk undersøkelse på salvieekstrakt i behandling av pasienter med mild til moderat Alzheimers sykdom, og resultatet var lovende. Salvieekstrakt har dessuten vist antihyperlipidemi aktivitet, antiproteaseaktivitet, hepatoprotektiv aktivitet, antimutagen aktivitet, hypoglykemisk aktivitet, antihypertensiv aktivitet, antispasme aktivitet, immunomodulerende aktivitet. Ekstraktet er også rapportert å ha angstløsende og sedative egenskaper.

Den eteriske oljen til salvie inneholder mye α -thujon og kamfer, som er rapportert å være toksiske ved peroralt inntak. α -Thujon i høye doser kan fremkalle konvulsjoner. Det er dessuten rapportert å stimulere musklene i uterus og fremkalle abort. Inntak av kamfer i doser mellom 50 og 150 mg/kg kan være dødelig som følge av koma og respirasjonsstans.

Det er mange faktorer som kan påvirke den kjemiske sammensetningen til salvie, og fra en rekke studier er det rapportert at variasjoner i individer, kjemotyper, plantedeler, årstider og steder er av betydning. En del studier har vist at *in vitro* kulturer kan være et godt alternativ til produksjon av fenoliske antioksidanter fra salvie, fordi tilsetning av veksthormoner og miljøfaktorer som temperatur, lys og atmosfærisk sammensetning lett kan kontrolleres.

Forkortelser

Tabell 1. Liste over forkortelser i oppgaven

ABTS ⁺	Radikalkation 2,2'-azinobis(3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre)
Ach	Acetylcholin
AchE	Acetylcholinesterase
AD	Alzheimers sykdom
APCI	Atmosfærisktrykk kjemisk ionisasjon
BuChE	Butyrylcholinesterase
CDCl ₃	Deuterokloroform
CNS	Sentralnervesystemet
COX	Cyklooksygenase
CYP	Cytokrom P450
D ₂ O	Tungtvann, deuteriumoksid
DAD	Diode Array-detektor
DCM	Diklormetan
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
DPPH	1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl
EtOAc	Etylacetat
EtOH	Etanol
FABMS	Hurtig atombombarderende massespektroskopi
FID	Flammeionisasjonsdeteksjon
GABA	Gamma aminosmørsyre
GAE	Gallesyreekvivalenter
GC	Gasskromatografi
GSH	Glutation (redusert form)
GSHPX	Glutation peroksidase
GST	Glutation-S-transferase
13-HPODE	13-hydroperoksy-(9Z,11E)-oktadekadiensyre
H ₂ O ₂	Hydrogenperoksid
HepG2	Hepatocellulær carcinom cellelinje
HPLC	Høytrykksvæskeskromatografi
IC ₅₀	Konsentrasjonen som viser 50 % radikalscavenging
iNOS	Induserende nitrogenmonoksidsyntase
LDL	Low density lipoprotein
LO	Lipoksygenase
MASP	Mannosebindende lektin Serin Protease
MBC	Minimum baktericid konsentrasjon

MeOH	Metanol
MIC	Minimum inhiberende konsentrasjon
MCC	Minimum cidal konsentrasjon
MLC	Minimum letal konsentrasjon
MS	Massespektroskopi
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotidfosfat
NF-κB	Nukleærfaktor kappa-B
NMR	Kjernemagnetisk resonans
NO [•]	Nitrogenmonoksid
NO ⁻	Nitroksyl anion
¹ O ₂	Singlett oksygen
O ₂ ⁻	Superoksid
OH [•]	Hydroksylradikal
ONOO ⁻	Peroksynitritt
OSI	Oljestabilitet indeks
PPAR _γ	Peroksisom proliferator-aktivert reseptor gamma
ppm	Parts per million
RNS	Reaktive nitrogenspecies
RO [•]	Alkoksylradikaler
ROO [•]	Peroksyl radikal
ROS	Reaktive oksygenspecies
SD	Standard avvik
SOD	Superoksid dismutase
<i>t</i> -BHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoksid
TLC	Tynnsjikt kromatografi
TMS	Tetrametylsilan
UV	Ultrafiolett
VRE	Vancomycinresistente enterococcer
δ	Kjemisk skift

Hensikt med oppgaven

Denne hovedfagsoppgaven har videreført arbeidet som har blitt gjort av Kirubaharan Thiagarajah, Torunn Liljebäck og Karl E. Malterud på økologisk salvie og kryddersalvie i 2005. Forfatterne studerte antioksidantaktiviteten til økologisk dyrket salvie og kryddersalvie med hensyn til DPPH-scavenging og hemming av 15-lipoksygenase.

Hensikten med denne hovedfagsoppgaven var å studere antioksidant-, radikalscavenger- og 15-lipoksygenase (15-LO) hemningsaktiviteten til økologisk salvie og ikke-økologisk salvie (*Salvia officinalis* L.), samt isolere og identifisere innholdsstoffer i planten som hadde 15-LO hemmende og radikalscavengeraktivitet.

Frie radikaler og reaktive oksygenspecies (ROS) som dannes i overskudd i kroppen kan føre til oksidativ skade på viktige strukturelle og funksjonelle komponenter som lipider og proteiner, karbohydrater og DNA. 15-LO er antatt å spille en viktig rolle i utviklingen av peroksidering av "low density lipoprotein", som antas å være et nøkkeltrinn i utvikling av aterosklerose. Derfor er det av stor interesse å finne stoffer med antioksidantegenskaper og 15-LO-hemmende aktivitet.

Av helsemessige årsaker kunne det eksperimentelle arbeidet ikke fullføres, derfor ble oppgaven gjort om til en litteraturoppgave.

Salvie, *S. officinalis*, har siden oldtiden blitt anvendt mot en rekke sykdommer og lidelser, og ble høyt verdsatt som en medisinsplante. Litteraturdelen gikk ut på å belyse salviens kjemiske innholdsstoffer, biologiske aktivitet og medisinske egenskaper med vitenskapelige undersøkelser.

DEL 1: Antioksidanter i *Salvia officinalis* L.

Bakgrunn

***Salvia officinalis* L.**

Salvie, *Salvia officinalis* L., tilhører leppeblomstfamilien (Lamiaceae), og er en flerårig halvbusk som opprinnelig kommer fra Middelhavsområdet. Den har vært anvendt i folkemedisinen mot mange sykdommer og plager (Hjelmstad 2006). I Norge er salvie mest kjent som krydder. Men basert på den tradisjonelle bruken til salvie mot overdreven svetting, finnes det per i dag et naturlegemiddel ("No-Sweat") som inneholder salviebladekstrakt til bruk ved forbigående, overdreven svetting (Anonym 2006).

I *Forskrift om legemiddelklassifisering*, paragraf 4 ("Urtelisten") er salvie definert som legemiddel, men det er gjort unntak for bruk som krydder – da blir salvie regnet som handelsvare (Anonym 2007a).

Salvie er relativt godt undersøkt vitenskapelig, fordi den er en velkjent medisinsplante. Det har blitt gjort mange studier på den kjemiske sammensetningen til salvie, og listen over kjemiske komponenter i planten blir stadig lengre. Blant de medisinske egenskapene til salvie er antioksidantaktivitet en av de mest undersøkte. Men det ser ut til at ingen har studert 15-lipoksygenase (15-LO) hemmende aktivitet til salvie tidligere. Dessuten ser det ikke ut til at noen har undersøkt forskjellen mellom kommersiell salvie, slik den selges som krydder, og økologisk dyrket salvie heller. Derfor har Thiagarajah et al. gjort en studie som nettopp belyser dette temaet. Forfatterne rapporterte at det er forskjell mellom kryddersalvie og økologisk dyrket salvie, både når det gjaldt antioksidantaktivitet og innholdsstoffer. Økologisk dyrket salvie og kryddersalvie innholdt henholdsvis 1.3 og 0.8 % eterisk olje. Dessuten var økologisk salvie rikere enn kryddersalvie på både lipofile og hydrofile ekstraktivstoffer (7.2 og 10.4 % mot 5.4 og 4.8 %). Diklormetanekstraktene til økologisk salvie var i tillegg betydelig mer aktive som radikalscavengere og 15-LO hemmere. For etanolekstraktene var det mindre forskjeller. Forfatterne konkluderte med at den undersøkte prøven av økologisk salvie hadde bedre antioksidantaktivitet enn den undersøkte prøven av kryddersalvie, men at dette bør bekreftes av flere studier (Thiagarajah et al. 2005).

Frie radikaler

Et fritt radikal er et molekyl med minst et uparet elektron i det ytre skallet og som kan eksistere selvstendig. Levetiden til frie radikaler er vanligvis meget kort, da de er ustabile. Et fritt radikal vil søke etter et elektron fra et annet molekyl for å fullføre sin oktett, og dermed bli stabilisert. Hvis det andre molekylet er et ikke-radikal, vil det miste sitt elektron til det frie radikalet og selv bli omdannet til et fritt radikal. Men hvis to frie radikaler reagerer med hverandre, kan de fordele sine uparrede elektroner og danne en kovalent binding; det blir dannet et ikke-radikal. I de fleste tilfeller er det ikke-radikalet som dannes mindre reaktivt enn de to opprinnelige radikalene, men ikke alltid (Halliwell 2005).

Reaktive oksygenspecier (ROS)

Begrepet reaktive oksygenspecier omfatter både oksygenbaserte radikaler som superoksidradikalet ($O_2^{\cdot-}$) og hydroksylradikalet (OH^{\cdot}), og noen ikke-radikal derivater av oksygen slik som hydrogenperoksid (H_2O_2) og singlett oksygen (1O_2) (Halliwell 2005).

Reaktive nitrogenspecier (RNS)

Begrepet reaktive nitrogenspecier (RNS) omfatter nitrogenbaserte radikaler som nitrogenmonoksid (NO^{\cdot}) og ikke-radikal derivater av nitrogen som nitroksyl anion (NO^-) og peroksynitritt ($ONOO^-$) (Halliwell 2005).

Dannelse av frie radikaler

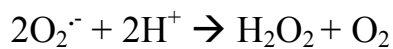
Frie radikaler dannes normalt i kroppen hele tiden, fordi de fungerer blant annet som signalmolekyler og er involvert i kroppens naturlige forsvar mot mikroorganismer. De dannes dessuten i energiomsetningen i mitokondriene. Men eksogene kilder som røntgenstråling, radioaktiv stråling, UV-lys (ved tilstedeværelse av oksygen og en endogen forbindelse eller et fotosensibiliserende legemiddel) og ikke minst tobakksrøyking kan fremme dannelse av frie radikaler (Devasagayam et al. 2004).

- **Superoksidradikalet**

Superoksidradikalet ($O_2^{\cdot-}$) dannes i nesten alle aerobe celler (Halliwell og Gutteridge 1985) i mitokondriene under elektrontransportkjeden som et resultat av at O_2 tar opp et elektron. Ved infeksjoner blir fagocytter aktivert til dannelse

av superoksid, som deltar i bekjempelsen av fremmede mikroorganismer (Halliwell 2005). Overaktivering av fagocytter og dannelsen av for store mengder superoksid fører derimot til skade, som ved kroniske inflammasjoner (Aruoma 1994). Det antas at superoksid kan ha metaboliske funksjoner som for eksempel intracellulært signalmolekyl (Halliwell 2005) og virker som vasokonstriktor ved å danne peroksynitritt for å motvirke effekten til nitrogenmonoksid (NO[•]) (Halliwell 1993).

Overskudd av superoksid (O₂^{•-}) *in vivo* fjernes ved å omdannes til hydrogenperoksid (H₂O₂). Denne reaksjonen går spontant, men hastigheten øker kraftig når den katalyseres av enzymet superoksid dismutase (SOD) (Halliwell 2005):

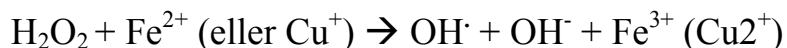


- **Hydrogenperoksid**

Hydrogenperoksid (H₂O₂) dannes i alle systemer som produserer superoksid ved hjelp av ikke-enzymatisk eller SOD-katalysert dismutasjon (Halliwell og Gutteridge 1985). Men hydrogenperoksid kan også dannes direkte av oksidase i celler. Dette ikke-radikalet fungerer som intracellulær sekundær budbringer og produserer tyroidhormoner i samarbeid med tyroid peroksidase (Halliwell 2005).

- **Hydroksylradikal**

Når kroppen utsettes for ioniserende stråling dannes hydroksylradikal (OH[•]) som et resultat av at O-H bindinger i vann brytes. *In vivo* blir hydroksylradikal dannet når hydrogenperoksid reagerer med jern- eller kobberioner (Halliwell 2005):



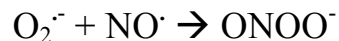
Dette radikalet er så reaktivt at det skader alt nærliggende straks det blir dannet *in vivo*, men det er dannelsesstedet som avgjør alvorlighetsgraden. Hvis dannelse av hydroksylradikalet skjer i nærheten av DNA, fører dette til base modifikasjon, mens dannelse i nærheten av et molekyl som er til stede i overskudd inni cellen ikke gir noen biologiske konsekvenser (Halliwell og Gutteridge 1985). Den skadelige effekten som ioniserende stråling har på levende organismer er knyttet til det innledende angrepet til hydroksylradikalet på proteiner, DNA og lipider (Halliwell 2005).

- **Nitrogenmonoksid**

Vaskulære endotelceller, fagocytter og mange andre celletyper syntetiserer nitrogenmonoksid (NO[•]) fra aminosyren L-arginin. Nitrogenmonoksid er involvert i makrofagenes parasittbekjempelse (Halliwell 2005), samt med på å regulere blodtrykket ved å virke relakserende på glattmuskulatur i blodåreveggen (Halliwell et al. 1992).

- **Peroksynitritt**

Nitrogenmonoksid og superoksid er frie radikaler som er lite reaktive, men de kan reagere med hverandre og danne et meget reaktivt ikke-radikal, peroksynitritt (ONOO⁻):



Peroksynitritt er sterkt peroksidierende og er skadelig for proteiner ved fysiologisk pH (Halliwell 1994).

Antioksidanter

En antioksidant er ”en substans som i lave konsentrasjoner sammenliknet med konsentrasjonen til det oksiderbare substratet, kan forsinke eller forhindre oksidasjon av dette substratet” (Halliwell 2005). Med andre ord er antioksidanter substanser som uskadeliggjør frie radikaler.

Kroppens antioksidantforsvar

Kroppen har utviklet et forsvarssystem med antioksidanter både intracellulært og ekstracellulært som uskadeliggjør frie radikaler. I mitokondriene og cytosol finnes superoksid dismutase (SOD) (Halliwell 1994). Det finnes flere former av SOD: Cu-Zn-SOD er vanligst, Fe-SOD og Mn-SOD finnes også. SOD katalyserer omdannelsen av superoksid til hydrogenperoksid. Hydrogenperoksid blir i sin tur omdannet til vann og oksygen av katalase eller glutathion peroksidase (GSHPX) (Halliwell 2005).

Dette forsvarssystemet klarer likevel ikke å uskadeliggjøre frie radikaler fullstendig, derfor finnes reparerende enzymer ekstracellulært. Disse ødelegger proteiner som er skadet, fjerner oksiderte fettsyrer fra membraner, og reparer oksidert DNA (Halliwell 1994). En mekanisme for reparasjon av oksidert DNA er ved å fjerne 8-hydroxyguanin enheter (Halliwell 2005).

I tillegg til reparerende enzymer, finnes enkelte proteiner som forhindrer katalysering av frie radikaler ved å kontrollere nivået til frie jern- og kobberioner (Halliwell 1994):

- Transferrin: Et transportprotein for jern i plasma
- Laktoferrin: Et protein som binder jern
- Caeruloplasmin: Et transportprotein for kobber i plasma
- Albumin: Et protein som blant annet kan fange enkelte frie radikaler og binde kobber.

Antioksidanter fra naturen

Antioksidanter kan også tilføres kroppen gjennom kosten. Noen av de viktigste antioksidantene er tokoferoler (vitamin E), askorbinsyre (vitamin C), flavonoider og karotenoider.

- **Vitamin E**

Begrepet vitamin E omfatter alle tokoferol- og tokotrienolderivater, og er en gruppe lipofile forbindelser som utøver sin antioksidant effekt i membraner og lipoproteiner. Den viktigste og mest effektive antioksidanten i denne gruppen er α -tokoferol, som har evnen til å bryte kjedereaksjonen til lipidperoksidering ved å fange peroksyldradikal intermedietet. Det har blitt beskrevet at α -tokoferol også kan fange singlet oksygen og reagere med peroksynitritt. Vitamin E finnes mye i blant annet vegetabiliske oljer, nøtter og noen grønnbladete grønnsaker (Stahl og Sies 1997).

- **Askorbinsyre**

Askorbinsyre er en vannløselig forbindelse og finnes i høye konsentrasjoner i mange vev. Når askorbinsyre interagerer med ROS, blir den oksidert til dehydroaskorbinsyre via askorbylradikalet. Enzymet dehydroaskorbinsyre reductase gjendanner askorbinsyre fra dehydroaskorbinsyre. Det har vist seg i *in vitro* studier at askorbinsyre har evnen til å regenerere tokoferol fra tokoferoksyldradikal som blir dannet under hemming av lipidperoksidering av α -tokoferol. Frukt, spesielt sitrusfrukter, tomater, bær og brokkoli inneholder mye askorbinsyre (Stahl og Sies 1997).

- **Flavonoider**

Begrepet flavonoider omfatter en stor familie av polyfenoliske forbindelser med C₁₅-skjelett og to aromatringer, som syntetiseres av høyere planter. Flavonoidene inndeles etter sin kjemiske struktur inn i undergrupper: *flavonoler*, *flavoner*, *catechiner*, *flavanoner*, *anthocyaniner*, *proanthocyanidiner* og *isoflavoner* (Malterud 2007). Mange flavonoider er sterke antioksidanter, hvilket er avhengig av den molekulære strukturen. Mange flavonoider, f.eks. quercetin, som tilhører undergruppen flavonoler, kan fange radikaler som superoksid, hydroksyl, alkoksyl og peroksy (Meltzer og Malterud 1997). Flere flavonoider er hemmere av 15-lipoksygenase og motvirker oksidasjon av LDL (low-density lipoprotein) (Malterud 1998). Det har blitt foreslått at flavonoider kan erstatte α - tokoferol som kjedebrytende antioksidant (Buhler og Miranda 2000). Gode kilder til flavonoider er te, rødvin, kakaobønner, sitrusfrukter, bær og grønnsaker (Malterud 2007).

- **Karotenoider**

Karotenoider er lipofile antioksidanter og presenteres i lipoproteiner som LDL og HDL. De har evnen til å fange singlet oksygen og peroksyldikaler. Det finnes mye karotenoider i gulrøtter, tomater, sitrusfrukter, spinat og mais (Stahl og Sies 1997).

Lipidperoksidering

Lipidperoksidering er en radikal kjedereaksjon som består av tre trinn: innledning, spredning og avslutning. I det innledende trinnet tar det frie radikalet et hydrogenatom fra metylengruppen (CH₂) i for eksempel et flerumettet fettsyre. Dermed står karbonatomet igjen med et uparet elektron ($\dot{\text{C}}\text{H}$), og radikalet blir stabilisert ved å rearrangere molekylet til et konjugert dien. Videre reagerer det med et oksygenmolekyl og danner et peroksy radikal (ROO \cdot). Dette radikalet har evnen til å ta et hydrogenatom fra en annen flerumettet fettsyre og dermed starter kjedereaksjonen. Slik vil det fortsette inntil substratet blir brukt opp. Men kjedereaksjonen kan brytes hvis det er en antioksidant med "kjedereaksjonsbrytende" egenskaper tilstede, som for eksempel α -tokoferol (Halliwell og Gutteridge 1985).

Hydroksylradikal, alkoksylradikaler (RO \cdot) og peroksyldikaler (ROO \cdot) kan innlede en lipidperoksidasjon. Sluttproduktene til kjedereaksjonen er forskjellige lipidperoksider og sykliske peroksider. *In vivo* blir nedbrytning av lipidperoksidene katalysert av kobber- og jernioner, og deres komplekser. Nedbrytningsproduktene inkluderer hydrokarbongasser, cytotoxiske aldehyder og samt radikaler som videre kan fjerne hydrogenatomer (Halliwell og Gutteridge 1985). Lipidperoksidering fører til skader på membranproteiner, samt at deres struktur og funksjoner endres (Halliwell 1994).

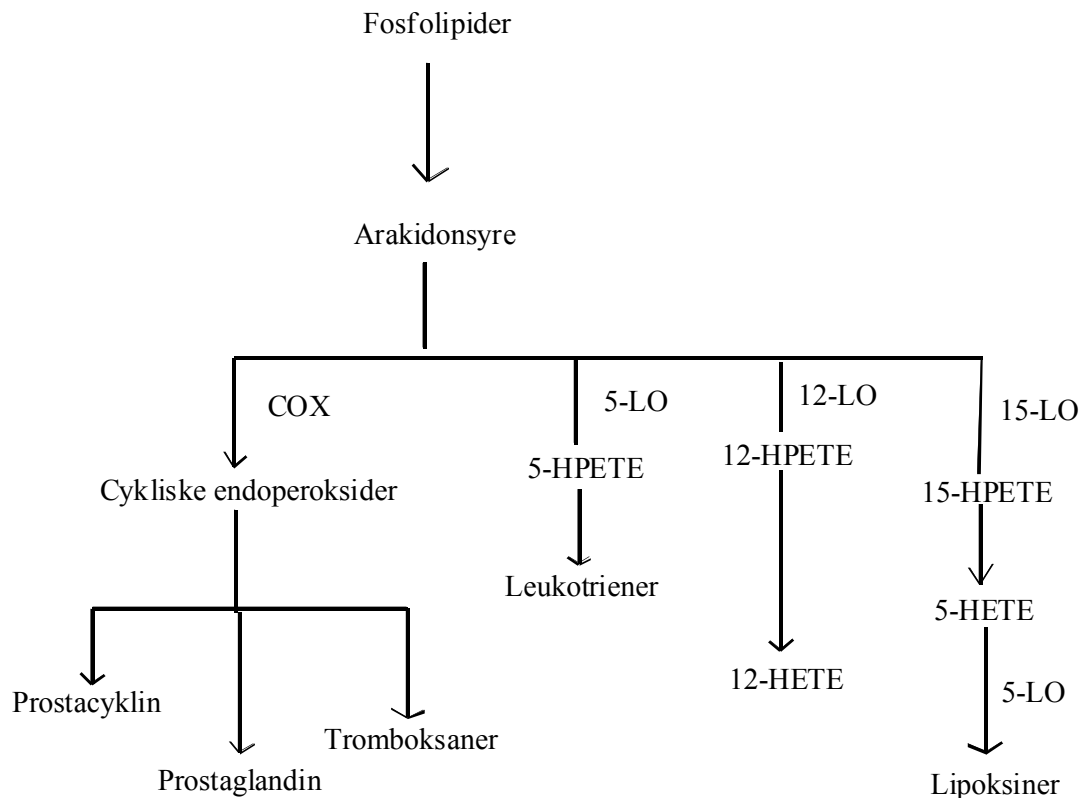
Oksidativt stress

Normalt er det en balanse mellom dannelse av frie radikaler og antioksidanter *in vivo*. Men når det skjer en forstyrrelse i denne balansen i retningen mot dannelse av mer frie radikaler, betegnes dette som oksidativt stress (Sies 1991). Ytre faktorer som for eksempel røntgenstråling, tobakksrøyking og giftige kjemikalier fremmer dannelsen av frie radikaler (Devasagayam et al. 2004). De fleste cellene kan tåle mildt oksidativt stress ved å øke antioksidantforsvaret. Men i de fleste tilfeller fører oksidativt stress til DNA fragmentering, økning av intracellulært fritt Ca^{2+} , ødeleggelse på membranion transportører og lipidperoksidering (Halliwell et al. 1992).

Oksidativt stress fører til endringer i biologiske molekyler slik at de mister sine former og funksjoner. Slike uønskede endringer i kroppen kan føre til utvikling av sykdommer. Oksidativt stress er derfor relatert til utvikling av mange sykdommer og er trolig en viktig årsak til aldring (Devasagayam et al. 2004). Overproduksjon av ROS kan føre til skade på vev. Men vevsskade kan også selv bidra til dannelse av ROS, slik at det kan føre til forverring av skaden (Aruoma et al. 1991).

Eikosanoider og lipoksygenaser

Eikosanoider er derivater av arakidonsyre, en C_{20} -flerumettet fettsyre som inneholder 4 dobbeltbindinger. Eikosanoidene er biologisk aktive forbindelser. Disse forbindelsene omfatter blant annet prostaglandiner, leukotriener og tromboksaner. Arakidonsyre finnes i cellemembranen som en av fettsyrene i fosfolipidene. Den frigjøres fra fosfolipidene ved hjelp av fosfolipaser (fosfolipase A_2 i ett-trinns prosess, fosfolipase C og deretter diacylglycerol lipase, eller fosfolipase C og deretter fosfolipase A_2 i to-trinns prosess). Den frie arakidonsyren metaboliseres av enten cyklooksygenase-1 og -2 (COX) til prostaglandiner, prostacykliner og tromboksaner, eller av lipoksygenasene (5-, 12- og 15- LO) til leukotriener og lipoksiner. Enzymet 5-LO er sannsynligvis det viktigste av lipoksygenasene og er det første trinnet i biosyntesen av leukotrienene. Det adderer en hydroperoksygruppe til C5 i arakidonsyre og 5-HPETE dannes. Denne forbindelsen er forløperen til leukotrienene. Enzymene 12-LO og 15-LO danner henholdsvis 12-HPETE og 15-HPETE i reaksjon med arakidonsyre. Ved hjelp av 5-LO omdannes 15-HPETE til lipoksiner (Rang et al. 1999).



Figur 1. Arakidonsyremetabolismen. COX= cyklooksygenase, LO= lipoksygenase (Rang et al. 1999).

15-LO antas å spille en rolle i flere patologiske tilstander. Enzymet peroksidiserer LDL (low-density lipoproteins), noe som er antatt å være viktig i utviklingen av aterosklerose. Det er i tillegg funnet at 15-HPETE hemmer syntesen av antiaggregerende prostacyklin og dermed virker protrombotisk (Sendobry et al. 1997; Steinberg 1999). Det er funnet en overekspresjon av 15-LO og metabolitter dannet ved 15-LO katalyserte reaksjoner i humane prostatakrefteceller, og 15-LO kan være med i utviklingen av prostatakrefte (Kelavkar et al. 2000; Kelavkar et al. 2001). Det er også en mulig sammenheng mellom overekspresjon av 15-LO og nedsatt reproduksjon og abort (Dar et al. 2001). 15-LO metabolitter kan imidlertid også spille positive roller, for eksempel i forbindelse med modning av retikulocytter (Ford-Hutchinson 1991). Det har vært foreslått at 15-LO aktivitet kan være av betydning for akrosomreaksjon i dannelsen av spermatozoer (Breitbart et al. 1995; Malterud et al. 1999).

Eksperimentelt

Materialer

- **Kjemikalier**

Tabell 2: Liste over kjemikalier

Aceton (p.a. eller teknisk)	Chemi-Teknik, Oslo, Norge
DCM	Merck, Darmstadt, Tyskland
DMSO	Merck, Darmstadt, Tyskland
DPPH	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Etanol	Arcus, Oslo
Etylacetat	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
d-kloroform (CDCl ₃)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Linolsyre	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
15-Lipoksygenase	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Metanol (p.a. eller teknisk)	Chemi-Teknik, Oslo, Norge
TMS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Vann, destillert	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge

- **Apparatur**

Tabell 3: Liste over apparatur

Analytisk TLC Silikagel 60 F ₂₅₄ , aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
Filterpapir S&S 597	Schleider & Schüll, Dassel, Tyskland
Kolonnekromatografi VersaFlash VersaPak, Silika, 4.0 x 150 mm	Supelco, Bellefonte, USA
Kyvetter Kvartskyvetter	Starna, Essex, England
Magnetrorer RCT basic	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
NMR Varian Gemini 200 Bruker DPX 300	Varian, Palo Alto, CA, USA Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Tyskland
Oljepumpe Edwards E-lab 2	Edwards High Vacuum International,

	Sussex, England
Ristemaskin IKA-VIBRAK-VXR	Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland
Rotavapor Büchi Rotavapor-R	Büchi, Flawil, Sveits
Sprayapparat TLC sprayer	Camag, MuttENZ, Sveits
UV-apparat UV-spektrofotometer: Shimadzu UV 160A Temperaturregulator: Shimadzu, CPS-controller Kyvetteholder: Shimadzu CPS-240A UV-spektrometer: Libra S32PC	Shimadzu Kyoto, Japan Biochrom, Cambridge, England
UV-lampe Model UVSL-58 (254 og 366 nm)	Ultra Violet Products, San Gabriel, CA, USA
Vekt Sartorius modell BP221S Sartorius modell A200S	Sartorius, Göttingen, Tyskland

Metoder

Metodeprinsipper:

- **Separasjonsmetoder**

Kolonnekromatografi VersaFlash

Kolonnekromatografi er en separasjonsmetode hvor mobilfasen er en væske og stasjonærfasen består av faste partikler pakket i en kolonne. Kolonnen monteres i en holder og kobles til en pumpe som driver mobilfasen gjennom kolonnen. Prøven som er i væskeform blir injisert øverst i kolonnen ved hjelp av en sprøyte. Når mobilfasen pumpes gjennom kolonnen vandrer stoffene nedover kolonnen med forskjellig hastighet på grunn av ulike interaksjoner med kolonnematerialet. Stoffene i prøven blir dermed separert og kan samles i beholdere som plasseres under kolonnen. I normalfase anvendes vanligvis silika-kolonner, mens det i omvendtfase vanligvis anvendes C18-kolonner som stasjonærfase. Mobilfasen velges på grunnlag av hvilke stoffer som skal separeres og hvilken stasjonærfase som brukes. Sammensetningen til mobilfasen kan varieres ved å anvende ulike blandinger av løsningsmidler og elueringen kan utføres isokratisk eller med gradient (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004), (Sigma-Aldrich 2007).

- **Identifikasjonsmetoder**

Tynnsjikt-kromatografi (TLC)

Tynnsjikt-kromatografi (TLC) er en analysemetode hvor mobilfasen er en væske og stasjonærfasen består av porøse partikler som spres utover som et tynt lag på en plate av glass, plast eller metall. I normalfasekromatografi benyttes silika som stasjonærfase og organiske løsningsmidler som mobilfase. Silanisert silika benyttes som stasjonærfase i omvendt-fase-kromatografi med vandige mobilfaser (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Noen μ l av prøveløsninger appliseres på platen og settes ned i et kar med mobilfase. Karet lukkes og mobilfase beveger seg oppover platen ved hjelp av kapillærkrefter. De påsatte prøvene blir separert ved at de vandrer langs platen med ulike hastigheter. Platen tas ut av karet når mobilfasen nærmer seg den andre enden og væskefronten avmerkes. Noen stoffer er fargede og kan detekteres med en gang. Stoffe som absorberer UV-lys blir først synlige ved at platen bestråles med lys. Tilslutt kan stoffene påvises ved å spraye med reagenser som reagerer med stoffene (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004).

Retensjonen til en forbindelse på platen beskrives av *retensjonsfaktor*, R_f . R_f -verdien defineres som:

$$R_f = a/b$$

a: avstanden fra startlinjen til midten av flekken

b: avstanden mellom startlinjen og fronten til mobilfase

NMR (nuclear magnetic resonance)-spektroskopi

NMR (kjernemagnetisk resonans)- spektroskopi er en identifikasjonsmetode som brukes til å bestemme strukturen til organiske forbindelser. Det er karbon-hydrogenskjelettet i en organisk forbindelse som identifiseres (Bruice 1998).

Noen atomkjerner har spinn og er magnetisk aktive. Eksempler på slike atomkjerner er ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P . En atomkjerne med spinn oppfører seg som en magnet, og orienterer seg tilfeldig i en forbindelse, ved fravær av magnetfelt. Når kjernene tilføres et eksternt magnetfelt, H_0 , orienteres spinnene enten med eller mot feltet. Kjernen som stiller seg med feltet er lavere i energi enn den som stiller seg mot feltet. Det vil derfor være flere kjerner som orienteres med magnetfeltet, H_0 (Bruice 1998).

Hvis elektromagnetisk stråling av passende frekvens tilføres kjerner som har blitt orientert av et magnetfelt, vil en kjerne som er i lavere energinivå absorbere energien og flippe sitt spinn over til et høyere energinivå. Absorpsjon av energien blir detektert og gir et signal i NMR-spekteret. Molekylet faller tilbake til det lave energinivået, og frigjør energi i form av varme. Begrepet "kjerne magnetisk resonans" kommer av at kjernen er i resonans med den påførte strålingen (Bruice 1998).

Protoner er omgitt av elektroner, slik at de er delvis skjermet fra det tilførte magnetfeltet. Høy elektrontetthet gir sterkere skjerming mot det ytre feltet. NMR-spektra viser tilført feltstyrke som øker fra venstre til høyre. Kjerner som er i den høyre delen av spektret er mer skjermet enn kjerner i den venstre delen av spektret. Da det er vanskelig å måle eksakt verdi av tilført magnetfelt der det skjer en absorpsjon, blir derfor en liten mengde tetrametylsilan, TMS, tilført prøven som referanse. Posisjonen i et NMR-spekter hvor det dukker opp et signal kalles kjemisk skift og skalaen er δ (delta). Signalet til TMS blir brukt til å definere nullposisjon på δ skala. Siden enhetene er Hz/MHz, har kjemisk skift enheten parts per million (ppm) (Bruice 1998):

$$\delta = \text{kjemisk skift (ppm)} = \frac{\text{Observert kjemisk skift (antall Hz vekk fra TMS)}}{\text{Spektrometer frekvens i MHz}}$$

I ^1H -NMR-spektroskopi går skalaen vanligvis fra 0 til 12 ppm, mens det i ^{13}C -NMR-spektroskopi går fra 0 til 220 ppm. Det er en fordel at skalaen strekker seg over et stort område, fordi det sjelden skjer overlapping av signaler. Men ^1H -NMR-spektroskopi har en stor fordel over ^{13}C -NMR-spektroskopi, fordi arealet under et ^1H -NMR signal er proporsjonalt med antall atomer som gir opphav til signalet (Bruice 1998).

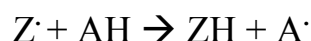
Prøven må være løst i deuterte løsningsmidler som CDCl_3 (deuterokloroform) og D_2O (deuteriumoksid), fordi deuterium signaler dukker ikke opp i ^1H NMR. Løsningsmidler med protoner kan ikke anvendes, fordi signalet for protonene til løsningsmidlet kan dekke over signalene til alle andre protoner (Bruice 1998).

- **Metoder for måling av biologisk aktivitet**

Radikalscavenging (DPPH-test)

1,1-Difenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) er et stabilt radikal, fordi dets uparrede elektroner delokaliseres over hele molekylet (Molyneux 2004). En løsning av dette radikalet har en dyp lilla farge på grunn av dets uparrede elektroner og har sterk absorbans ved 517 nm. Når en radikalfanger reagerer med DPPH-radikalet, blir det dannet et ikke-radikal, DPPH-H, slik at løsningen skifter farge fra dyp lilla til svak gul. DPPH-H har svak absorbans ved 517 nm. Reduksjon i absorbans er korrelert til reduksjon av DPPH og testen kan utføres ved hjelp av UV-spektrometri (Malterud et al. 1993).

DPPH-radikalet representerer frie radikaler, Z^\cdot , som dannes i et oksiderende system, slik som autoksidasjon av et lipid, og som undertrykkes av en radikalfanger, AH, ved reduksjon (Molyneux 2004):



Aktiviteten til en radikalfanger blir presentert som IC_{50} -verdi, det vil si konsentrasjonen til en radikalfanger som gir en reduksjon av 50 % DPPH-aktivitet (farge) (Molyneux 2004). IC_{50} -verdier bestemmes ved lineær interpolering mellom måling av punkter nærmest 50 % aktivitet (Malterud og Rydland 2000).

Reduksjon av DPPH kan beregnes i prosent etter følgende formel (Malterud et al. 1993):

$$100 * \frac{((A_0 * 0,983) - A_1)}{(A_0 * 0,983)}$$

A_0 : Absorbans i kyvetten før tilsetning av prøven

A_1 : Absorbans i kyvetten etter endt måletid

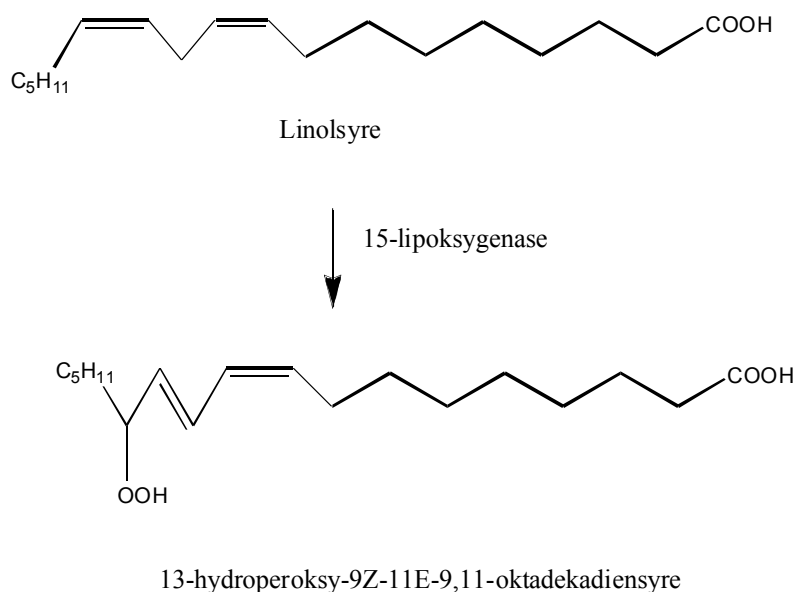
0,983 ($= 2,95 / 3$) brukes som korrigering, fordi det skjer en fortynning når prøveløsningen tilsettes DPPH-løsningen.

Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test)

Enzymet 15-lipoksygenase katalyserer oksidasjonen av arakidonsyre til 15-HPETE som videre til omdannes til eikosanoider. I denne testen benyttes 15-lipoksygenase (15-LO) fra soyabønner. Dette enzymet er billig, stabilt og enkelt å måle. Selv om 15-LO fra soyabønner ikke er identisk med mammalsk 15-LO, har det likevel gjentatte ganger vist god korrelasjon mellom inhiberingsverdier til disse to enzymene. Derfor er soyabønnelipoksygenase godt egnet til å teste hemmere av mammalsk 15-LO (Lyckander og Malterud 1992; Malterud og Rydland 2000; Gundersen et al. 2003; Gleason et al. 1995). Enzymløsningen oppbevares på is under forsøket, og kontroller måles med jevne mellomrom for å forsikre om at enzymaktiviteten holdes konstant (Malterud og Rydland 2000).

Linolsyre er mer stabil og billigere enn arakidonsyre. Dessuten hemmes 15-lipoksygenasekatalysert peroksidering på linolsyre og arakidonsyre omtrent lik, derfor brukes linolsyre som substrat for 15-LO i stedet for arakidonsyre (Lyckander og Malterud 1992).

Linolsyre har en 1,4-dienstruktur som ved peroksidering omdannes til 13-hydroperoksy-(9Z,11E)-oktadekadiensyre (13-HPODE) (figur 1) (Gardner 1991; Gleason et al. 1995; Lyckander og Malterud 1996).



Figur 2. Reaksjon mellom linolsyre og 15-LO (Sæther 1999).

13-HPODE har to konjugerte dobbeltbindinger, hvilket gjør at forbindelsen har UV-absorbans ved 230-235 nm. Peroksidering av linolsyre vil øke absorbansen ved 234 nm proporsjonalt med konsentrasjonen av 13-HPODE som dannes.

Denne absorbansøkningen registreres i prøver uten hemmer. Absorbansøkningen blir mindre når det tilsettes en 15-LO-hemmer (Gutteridge og Halliwell 1990).

Økning i absorbans i prøver med og uten hemmer etter tilsetning av enzym måles ved hjelp av UV-spektrometri.

Prosentvis enzymhemming beregnes etter følgende formel (Lyckander og Malterud 1992):

$$100 * (A_2 - A_1) / A_2$$

A₁: Absorbansøkning (AU/min) for prøve med hemmer

A₂: Absorbansøkning for prøve uten hemmer

Linolsyre løses i boratbuffer med pH 9.00. Mesteparten av linolsyre vil være ionisert da den har pK_a-verdi 4.77. Løseligheten til linolsyre blir også bedre, fordi linolsyre blir løst i 150 µl etanol før tilsetning av buffer. Dermed oppnås en løsning som er meget klar, hvilket er viktig for å måle riktig absorbans (Haining og Axelrod 1958).

Generelle eksperimentelle metoder:

- **Kolonnekromatografi**

Fremgangsmåte:

Kolonnen ble montert i en holder og koblet til en pumpe. Et passende elueringsmiddel ble pumpet gjennom kolonnen, slik at den ble fuktig og klar til å motta prøven. Ekstraktet ble løst i løsningsmidlet som ble anvendt til ekstrahering av plantematerialet. Løsningen ble filtrert og filtratet ble injisert øverst i kolonnen. Elueringsmidlet ble pumpet gjennom kolonnen, og stoffene i prøven ble separert nedover kolonnen. Under kolonnen ble det plassert små glassbeholdere for å samle opp fraksjonene. Elueringen foregikk med gradient ved at elueringsmidlet ble gjort mer polart. Tilslutt ble kolonnen vasket med diklormetan, DCM, for å skylle ut rester.

Løsninger og reagenser:

DCM-ekstraktet ble løst i DCM. DCM, blandinger av DCM og etylacetat, og aceton ble brukt til eluering av prøven. DCM ble brukt til å vaske kolonnen.

- **Tynnsjikt-kromatografi (TLC)**

Fremgangsmåte:

10 µl av hver fraksjon ble applisert på en silikaplate og satt ned i et kar med ønsket mobilfase. Etter kromatograferingen ble platen belyst med UV-lampe (kort- og langbølget) og synlige flekker ble avmerket. Platen ble videre sprayet med Ceric-reagens og varmet opp til 100 °C i 10 minutter for å fremkalle flekker som ikke ble synlige under UV-lampen.

Løsninger og reagenser:

DCM, blandinger av DCM og etylacetat, og aceton ble brukt til å lage mobilfase.

- **NMR-spektroskopi**

Fremgangsmåte:

Litt prøvesubstans ble løst i 1 ml deutert løsemiddel tilsatt 1 dråpe TMS. Prøveløsningen ble overført til et NMR-rør til analyse i et NMR-spektrometer.

- **Radikalscavenging (DPPH-test)**

Fremgangsmåte:

UV-spektromeret ble nullstilt med en blindprøve som bestod av metanol. DPPH ble løst i metanol og løsningen ble innstilt til en absorbans på mellom 0.9-1.1 ved 517 nm ved hjelp av UV-spektromeret. Prøvesubstansene ble løst i dimetylsulfoksid (DMSO) ved tillaging av fortynningsrekker. Absorbansen ved start, A_0 , ble målt i 2.95 ml DPPH-løsning ved 517 nm. Deretter ble 50 µl prøveløsning satt til DPPH-løsningen og blandet godt med en plastspatel. Absorbansen ble registrert 30 sekunder etter tilsetning av prøveløsning og ble målt hvert 60. sekund i 5 minutter. Det ble utført tre paralleller av hver prøve.

- **Hemming av 15-lipoksygenase (15-LO test)**

Løsninger og reagenser:

DMSO ble brukt til å lage fortynningsrekker av prøvene.

- A: Boratbuffer 0.2 M pH 9 var laget av borsyre og natriumhydroksid
- B: Substratløsning: 50 µl linolsyre og 150 µl metanol blandes. Deretter tilsettes A til 50 ml. 15 ml av denne løsningen blandes med 225 ml A. Løsningen ble laget rett før forsøket.
- C: Enzymløsning: 15-LO ble løst i A til en konsentrasjon som gir absorbansøkning på 0.4-0.5 AU/min. Løsningen ble laget rett før bruk og ble oppbevart på is under hele forsøket.
- D: Blindprøve: 0.95 ml A, 2.00 ml B, 0.05 ml DMSO

Fremgangsmåte:

UV-spektrometeret ble nullstilt med D.

Måling av peroksidering av substrat uten hemmer:

A (0.90 ml), B (2.00 ml) og 0.05 ml DMSO ble blandet godt sammen i kvartskyvettene med en plastspatel, deretter ble C (0.05 ml) tilsatt med påfølgende omrøring. Absorbansøkningen ble målt fra 30 til 90 sekunder etter tilsetning av C. Dette ble gjort før forsøket, etter hver tredje måleserie og tilslutt, for å sjekke om enzymaktiviteten holdt seg stabil gjennom forsøket. Det ble utført fire paralleller.

Måling av peroksidering av substrat med hemmer:

A (0.90 ml), B (2.00 ml) og 0.05 ml prøveløsning ble blandet sammen i kvartskyvetten med en plastspatel, deretter ble C (0.05 ml) tilsatt og rørt om med plastspatelen. Absorbansøkningen ble målt fra 30 til 90 sekunder etter tilsetning av C.

Eksperimentell utførelse**Utgangsmateriale**

Plantematerialet var tørket overjordisk del til planten *Salvia officinalis*. Det ble anvendt plantemateriale fra to forskjellige kryddersalvier og en økologisk dyrket salvie. Kryddersalviene av merkene "Santa Maria" og "Jasmin" ble kjøpt i dagligvarebutikken. Økologisk salvie (Økosalvie) ble kjøpt fra Øko-Urt.

Diklormetan-ekstraksjoner

Kryddersalvie "Santa Maria", 64.0 g, ble ekstrahert med ca. 0.5 L diklormetan (DCM). Blandingen stod til neste dag, for at upolare stoffer fra plantematerialet skulle få tid til å trekke ut i løsningen. Deretter ble blandingen filtrert, og filtratet ble dampet inn til tørrhet på rotavapor. Ekstraksjonen av plantematerialet ble gjentatt fire ganger. Dette ble ansett som tilstrekkelig, da utbyttet ikke økte betraktelig mer.

Kryddersalvie "Jasmin", 121.4 g, ble ekstrahert fem ganger med ca. 1.0 L DCM på samme måte som forklart over.

Økologisk salvie, 721.0 g, ble ekstrahert fem ganger med ca. 4.5 L DCM på samme måte som beskrevet over.

MeOH-ekstraksjoner

Plantematerialet av kryddersalvie "Santa Maria" fra DCM-ekstraksjonen ble ekstrahert med ca. 0.5 L metanol. Blandingen stod til neste dag, for at mindre upolare stoffer fra plantematerialet skulle få tid til å trekke ut i løsningen. Deretter ble blandingen filtrert, og filtratet ble dampet inn til tørrhet på rotavapor. Ekstraksjonen av plantematerialet ble gjentatt fire ganger. Dette ble ansett som tilstrekkelig, da utbyttet ikke økte betraktelig mer.

Plantematerialet av kryddersalvie "Jasmin" fra diklormetan-ekstraksjonen ble ekstrahert fem ganger med ca. 1.0 L metanol som beskrevet over.

Plantematerialet av økologisk salvie fra diklormetan-ekstraksjonen ble ekstrahert fire ganger med ca. 3.0 L metanol som beskrevet over.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -NMR-spektra av alle ekstraktene (vedlegg 1, 3, og 5).

Det ble tatt ^{13}C -NMR-spektra av alle ekstraktene (vedlegg 2, 4, og 6).

Bioassay

Det ble utført DPPH-test (tabell 5 og 8) og 15-LO test for ekstraktene (tabell 6 og 9). DCM-ekstraktene ble testet i konsentrasjonene 5, 2.5, og 1.25 mg/ ml. Disse tilsvarer konsentrasjoner i løsningene som ble målt på 83.3, 41.7, og 20.8 $\mu\text{g/ml}$.

MeOH-ekstraktene til Økosalvie og kryddersalvie fra "Santa Maria" ble testet i konsentrasjonene 5, 2.5, 1.25, 0.625, og 0.3125 mg/ ml. Disse tilsvarer konsentrasjoner i løsningene som ble målt på 83.3, 41.7, 20.8, 10.4, og 5.2 $\mu\text{g/ml}$. MeOH-ekstrakten til kryddersalvie fra "Jasmin" ble testet på sluttkonsentrasjonene 83.3, 41.7, 20.8, og 10.4 $\mu\text{g/ml}$.

Fraksjonering av DCM-ekstrakt av Økosalvie med kolonnekromatografi (Versaflash)

Økosalvie DCM-ekstrakt, ca. 5 gram ble løst i 20 ml DCM og filtrert. Filtratet ble injisert inn i en silika-kolonne (VersaPak, 40 x 150 mm) som var gjennomfuktet med ca. 500 ml DCM. Elueringen foregikk med gradient ved at elueringsmidlets sammensetning økte med andelen etylacetat i forhold til DCM: DCM-EtOAc ca. 500 ml (99:1), DCM-EtOAc ca. 80 ml (95:5), DCM-EtOAc ca. 700 ml (90:10), DCM-EtOAc ca. 260 ml (75:25), DCM-EtOAc ca. 500 ml (50:50), EtOAc ca. 300 ml. Deretter ble aceton (ca. 150 ml) brukt som elueringsmiddel. Hele kolonnen ble tilslutt pumpet gjennom med DCM (ca. 300

ml) for å vaske gjenværende stoffer. I alt ble det samlet opp 132 fraksjoner a 20 ml, unntatt den 132. fraksjonen som var på ca. 250 ml.

Tynnsjiktchromatografi (TLC)

Fraksjoner fra DCM-ekstrakt av Økosalvie ble undersøkt ved normalfase TLC (Silikagel 60F₂₅₄)

Platene med fraksjonene 1- 31 ble utviklet med mobilfase som bestod av DCM. Platene med fraksjonene 32- 62 ble utviklet med mobilfase som bestod av DCM: EtOAc (95:5).

Platene med fraksjonene 63- 79 ble utviklet med mobilfase som bestod av DCM: EtOAc (90:10).

Platene med fraksjonene 80- 96 ble utviklet med mobilfase som bestod av DCM: EtOAc (75:25)

Platene med fraksjonene 97- 132 ble utviklet med mobilfase som bestod av aceton.

Etter kromatograferingen ble platene belyst med både kort- og langbølget UV-lys. Stoffer som absorberte UV-lys eller fluorescerte ble avmerket. Platene ble deretter sprayet med Ceric-reagens og varmet opp til 100°C i 10 minutter for å fremkalle eventuelle stoffer som ikke ble synlige under UV-lampen. Fraksjoner som hadde flekker med samme vandringslengde og farge ble antatt som like og slått sammen. Disse ble dampet inn til tørrhet i rotavapor og oljepumpe. Dette ga fraksjonene **2- 27**. (Fraksjon 1 var tom). Fraksjonene **2-27** ble analysert med NMR-spektroskopi.

NMR-spektroskopi

Det ble tatt ¹H-NMR-spektra av fraksjonene 2-27.

Det ble tatt ¹³C-NMR-spektra av fraksjon 3, 10 og 15.

Bioassay

Det ble utført DPPH-test for fraksjonene 3-17 (tabell 10). Fraksjonene 3, 4, 5, 8, 9 og 10 ble testet i konsentrasjonen 83.3 µg/ml. Fraksjon 15 ble testet i konsentrasjon 83.3 og 41.7 µg/ml. Fraksjonene 6, 7, 11, 12, 13, 14, 16 og 17 ble testet i konsentrasjonene 83.3, 41.7, og 20.8 µg/ml. Fraksjon 12 og 13 ble i tillegg testet i konsentrasjon 10.4 µg/ml.

Resultat og diskusjon

DCM-ekstraktene

De mest upolare stoffene fra plantematerialet ble ekstrahert over i DCM. Tabell 4 viser utbytte av plantematerialet i gram og prosent.

Tabell 4: Utbytte fra ekstraksjon

Ekstrakt	Utbytte av plantemateriale i gram (g)	Utbytte av plantemateriale i prosent (%)
Kryddersalvie "Santa Maria"	5.95	9.3
Kryddersalvie "Jasmin"	10.55	8.7
Økosalvie	62.65	8.7

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektret til DCM-ekstraktene (vedlegg 1, 3, og 5) viste mange intense signaler i alifatområdet. Dette tyder på innhold av alifatiske forbindelser og fett. Toppene i området 0,6-1,0 ppm kan tyde på terpenoider. Toppene i området 2,0-2,8 ppm kan stamme fra protoner som er deshieldet på grunn av karboksylsyregrupper eller dobbeltbindinger. Det var noen færre og lavere topper i aromat- og olefinområdet. ¹³C-NMR-spektrene (vedlegg 2, 4, og 6) bekreftet funnene som ble gjort i protonspektret. NMR-spektrene tyder på at DCM-ekstraktene inneholder mange hydrofobe forbindelser, noe som var forventet fordi DCM er et upolart løsningsmiddel.

Bioassay

DPPH-test:

Rekkefølgen for radikalscavengeraktivitet til DCM-ekstraktene var kryddersalvie "Santa Maria" > kryddersalvie "Jasmin" > Økosalvie med henholdsvis IC₅₀-verdier på 30.4 ± 0.6, 33.0 ± 2.0 og 35.0 ± 3.0 µg/ml (tabell 5).

Tabell 5: DCM-ekstraktenes konsentrasjon for 50 % DPPH-scavenging.

Ekstrakt fra	IC ₅₀ (µg/ml)
Kryddersalvie "Santa Maria"	30.4 ± 0.6
Kryddersalvie "Jasmin"	33.0 ± 2.0
Økosalvie	35.0 ± 3.0

Hemming av 15-LO:

Aktiviteten for hemming av 15-LO til DCM-ekstraktene var i rekkefølgen kryddersalvie "Santa Maria" > kryddersalvie "Jasmin" > Økosalvie med henholdsvis IC₅₀-verdier på 33 ± 6, 36 ± 4 og 42 ± 5 µg/ml (tabell 6).

Tabell 6: DCM-ekstraktenes konsentrasjon for 50 % hemming av 15-LO.

Ekstrakt fra	IC ₅₀ (µg/ml)
Kryddersalvie ”Santa Maria”	33 ± 6
Kryddersalvie ”Jasmin”	36 ± 4
Økosalvie	42 ± 5

MeOH-ekstraktene

De ikke fullt så upolare stoffene fra plantematerialet ble ekstrahert over i MeOH. Tabell 7 viser utbytte av plantematerialet i gram og prosent.

Tabell 7: Utbytte fra ekstraksjon.

Ekstrakt	Utbytte av plantemateriale i gram (g)	Utbytte av plantemateriale i prosent (%)
Kryddersalvie ”Santa Maria”	7.76	12.1
Kryddersalvie ”Jasmin”	14.81	12.2
Økosalvie	94.72	13.1

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektret til MeOH-ekstraktene (vedlegg 7, 9, og 11) viste mange signaler i alifatområdet (0,6 – 2,8 ppm). Dette tyder på innhold av alifatiske forbindelser. I området 3 - 5,5 ppm var det mange kraftige signaler, som kan stamme fra karbohydrater. Det var mindre intense signaler i området 6-8 ppm som kan stamme fra aromater. Ved 6,26 og 7,51 ppm var det dubletter som kan skyldes transolefiniske protoner i et kanelsyrederivat, for eksempel kaffesyre eller rosmarinsyre. Disse signalene var å finne i alle rækstraktene. Signaler fra området 4,4 – 5,5 ppm kan skyldes protoner som sitter på C₁ (anomerprotoner). ¹³C-NMR-spektrene (vedlegg 8, 10, og 12) bekreftet funnene som ble gjort i protonspektret.

Bioassay

DPPH-test:

Aktiviteten for DPPH-scavenging til MeOH-ekstraktene var i rekkefølgen Økosalvie > kryddersalvie ”Santa Maria” > kryddersalvie ”Jasmin” med henholdsvis IC₅₀-verdier på 17.9 ± 0.4, 24.0 ± 2.0 og 27.3 ± 1.3 µg/ml (tabell 8).

Tabell 8: MeOH-ekstraktenes konsentrasjon for 50 % DPPH-scavenging.

Ekstrakt fra	IC ₅₀ (µg/ml)
Kryddersalvie ”Santa Maria”	24.0 ± 2.0
Kryddersalvie ”Jasmin”	27.3 ± 1.3
Økosalvie	17.9 ± 0.4

Hemming av 15-lipoksygenase:

Aktiviteten for hemming av 15-LO til MeOH-ekstraktene var i rekkefølgen kryddersalvie ”Santa Maria” > Økosalvie > kryddersalvie ”Jasmin” med henholdsvis IC₅₀- verdier på 50 ± 3, 58 ± 4 og 62 ± 6 µg/ml (tabell 9).

Tabell 9: MeOH-ekstraktenes konsentrasjon for 50 % hemming av 15-LO.

Ekstrakt fra	IC ₅₀ (µg/ml)
Kryddersalvie ”Santa Maria”	50 ± 3
Kryddersalvie ”Jasmin”	62 ± 6
Økosalvie	58 ± 4

Fraksjonering av DCM-ekstrakt av Økosalvie

Samlet utbytte var 2,79 gram. (1,49 gram ekstrakt ble igjen på filterpapiret etter filtrering før applisering). Se vedlegg 42, s. 55 for resultat av fraksjoneringen.

NMR-spektroskopi

¹H-NMR-spektret til fraksjon 2 (vedlegg 13) viste kraftige signaler i alifatområdet og noen små topper i olefinområdet.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 3 (vedlegg 14) viste signaler i alifatområdet, litt færre topper i olefin- og aromatområdet. ¹³C-NMR-spekret (vedlegg 15) bekreftet funnene som ble gjort i protonspekret, samt at det hadde et lite signal i området 81 ppm som kan tyde på et alifatisk karbonatom bundet til et oksygen.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 4 (vedlegg 16) viste signaler i alifatområdet. Det var en multiplett rundt 2,0 ppm og to tripletter i området 2,2-2,8 ppm (–CH=CH₂-CH=, eller delstrukturen –CO-CH₂-CH₂). Toppen i området 2,0-2,2 ppm kan tyde på delstrukturen =CH-CH₂-CH₂. Det var også noen små topper i aromat- og olefinområdet.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 5 (vedlegg 17) viste signaler i alifatområdet, ellers så det ikke ut til å inneholde forbindelser av interesse. Dette var også en liten fraksjon.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 6 (vedlegg 18) viste tydelige signaler i alifatområdet, ellers også noen små topper i aromat- og olefinområdet.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 7 (vedlegg 19) viste signaler i alifatområdet. Men det var også mange små topper i olefin- og aromatområdet.

^1H -NMR-spektret til fraksjon 8 (vedlegg 20) viste signaler i alifatområdet, ellers bare noen små signaler i olefinområdet.

^1H -NMR-spektret til fraksjon 9 (vedlegg 21) viste signaler i alifatområdet, samt tydelige topper i olefinområdet. Det var en dobbel dublett i området 5,8-6,0 ppm og to dubletter i området 5,0-5,3 ppm.

^1H -NMR-spektret til fraksjon 10 (vedlegg 22) viste mindre signaler i alifatområdet, men skarpere og høyere topper i olefinområdet sammenliknet med protonspektret til fraksjon 9. Det så ut til at fraksjon 10 og 9 kan inneholde de samme forbindelsene, men at det var mest i fraksjon 10. ^{13}C -NMR-spektret til fraksjon 10 (vedlegg 23) bekreftet funnene i protonspektret. Forbindelsen i fraksjon 10 ble funnet til å være manool, ved sammenlikning av ^1H -NMR og ^{13}C -NMR-spektra fra publiserte data (Bastard et al. 1984; Perry et al. 1996). Denne forbindelsen har blitt funnet i salvie tidligere (Perry et al. 1996; Velickovic et al. 2003a).

^1H -NMR-spektret til fraksjon 11 (vedlegg 24) viste signaler i alifatområdet. Signaler i olefinområdet fra fraksjon 10 viste seg her også, men i mindre grad. Det har i tillegg dukket opp en ny topp i området 6,5 ppm.

^1H -NMR-spektret til fraksjon 12 (vedlegg 25) viste signaler i alifatområdet. I området 4,0-4,2 ppm var det en liten kvartett. De signalene som ble funnet i fraksjon 10 har nesten flatet helt ut. Den nye toppen i området 6,7 ppm som dukket opp i fraksjon 12 har blitt større.

^1H -NMR-spektret til fraksjon 13 (vedlegg 26) liknet veldig mye på protonspektret til fraksjon 12. Det er derfor sannsynlig at disse to fraksjonene inneholder samme forbindelser.

^1H -NMR-spektret til fraksjon 14 (vedlegg 27) liknet også mye på protonspektret til fraksjon 12 og 13. Men det har i tillegg dukket opp en ny, kraftig topp i området 3,71 ppm. Dette kan tyde på protonet i en metoksygruppe bundet til en aromat.

^1H -NMR-spektret til fraksjon 15 (vedlegg 28) liknet protonspektret til fraksjon 14 med en singlett i området 3,71 ppm. I tillegg har det dukket opp en singlett i området 6,50 ppm som kan tyde på et proton bundet til en aromat. Kvartetten i området 4,0-4,2 ppm fra fraksjonene 12, 13 og 14 var å finne igjen i dette spektret. I tillegg har det dukket opp en kvintett i området 3,2 ppm. Det var også ganske intense signaler i området 0,6 til 2,8-3,0 ppm som kan tyde på at denne fraksjonen inneholder terpenoider og alifater. ^{13}C -NMR-spektret til fraksjon 15 (vedlegg 29) viste en kraftig topp i området 181,3 ppm som kan tyde på en

karbonylgruppe. I området 117,8 til 147,6 ppm var det seks kraftige topper som kan tyde på aromatiske og olefiniske karboner. Det var en kraftig topp ved 61,5 ppm som kan tyde på en metoksygruppe bundet til en aromat. I alifatområdet var det et komplisert mønster med mange kraftige topper.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 16 (vedlegg 30) liknet på protonspektret til fraksjon 15 med den kraftige toppen i området 3,71 ppm. Men kvartetten i området 4,0-4,2 ppm har blitt utydelig, det samme gjaldt kvintetten i området 3,2 ppm. Derimot har det dukket opp noen små topper i aromatområdet.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 17 (vedlegg 31) viste mye av de samme signalene som protonspektret til fraksjon 16. Det er derfor grunn til å tro at de inneholder like forbindelser.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 18 (vedlegg 32) viste signaler i alifatområdet. Toppen i området 3,7 ppm som ble funnet i protonspektrene 14, 15, 16 og 17 har blitt mindre.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 19 (vedlegg 33) viste signaler i alifatområdet. Det var noen små topper i aromatområdet.

¹H-NMR-spektret til fraksjon 20 (vedlegg 34) viste signaler i alifatområdet. Det var mange små topper i olefinområdet. I området rundt 7,0 ppm og 7,7 ppm var det to dubletter som kan tyde på to protoner bundet til en aromat.

¹H-NMR-spektret til fraksjonene 21-27 (vedlegg 35-41) så ikke ut til å inneholde forbindelser av interesse.

Bioassay

DPPH-test:

DPPH-test ble utført på fraksjonene 3-17, av disse hadde fraksjon 13 høyest radikalscavengeraktivitet med IC_{50} -verdi på $17.2 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ (tabell 10). Fraksjonene 3, 4, 5, 8 og 10 hadde lav radikalscavengeraktivitet (under 50 % ved høyeste målte konsentrasjon), derfor ble det ikke funnet IC_{50} -verdi for disse. Fraksjon 9 scavenget $76.8 \pm 2.3 \%$ DPPH-radikal ved konsentrasjon $83.3 \mu\text{g/ml}$, men siden denne fraksjonen ikke ble målt i lavere konsentrasjoner, ble det heller ikke funnet IC_{50} -verdi. Tabell 11 viser radikalscavengeraktiviteten til disse fraksjonene i prosent.

Tabell 10: IC_{50} -verdi for fraksjoner ved DPPH-scavenging.

Fraksjon	DPPH-scavenging IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
6	29.6 ± 0.8
7	35.5 ± 1.1
11	27.5 ± 1.1
12	19.0 ± 1.0
13	17.2 ± 0.4
14	31.0 ± 2.0
15	49.8 ± 0.5
16	22.4 ± 0.9
17	44.0 ± 1.0

Tabell 11: DPPH-scavenging i prosent for fraksjon 3, 4, 5, 8, 9, og 10 ved $83.3 \mu\text{g/ml}$.

Fraksjon	DPPH-scavenging i %
3	0.2 ± 0.3
4	13.1 ± 0.5
5	35.4 ± 2.8
8	7.1 ± 0.1
9	76.8 ± 2.3
10	3.5 ± 0.2

MeOH-ekstraktene

Det eksperimentelle arbeidet ble avbrutt, derfor ble MeOH-ekstraktene ikke videre undersøkt.

Konklusjon

Det er vanskelig å trekke en konklusjon, siden det eksperimentelle arbeidet ikke ble fullført. Men ut fra resultatene som foreligger, har salvieekstrakt vist god antioksidantaktivitet og 15-LO-hemming. Metanolekstraktene viste bedre evne til å scavenge DPPH-radikal enn diklormetaneekstraktene. Blant metanolekstraktene var økologisk salvie mest aktiv som radikalscavenger med IC_{50} -verdi på $17.9 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$. Diklormetaneekstraktene viste høyere aktivitet enn metanolekstraktene i 15-LO-hemming. I denne metoden var diklormetaneekstrakt av kryddersalvie fra "Santa Maria" den mest aktive med IC_{50} -verdi på $33.0 \pm 6 \mu\text{g/ml}$.

Fra fraksjon 10, isolert fra diklormetaneekstraktet til økologisk salvie, ble det funnet manool. Identifiseringen var basert på ^1H - og ^{13}C -NMR-spektra. Men denne fraksjonen var nær inaktiv som radikalscavenger (3.5 % radikalscavenging målt i konsentrasjon $83.3 \mu\text{g/ml}$). Det har heller ikke blitt rapportert at manool er en antioksidant. Fraksjon 13 isolert fra samme ekstraktet viste seg å være en god radikalscavenger med IC_{50} -verdi på $17.2 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$.

Litteraturliste

Aruoma, O.I. (1994). Free radicals and antioxidant strategies in sports. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **5**: 370-381.

Aruoma, O.I., Kaur, H og Halliwell, B (1991). Oxygen Free-Radicals and Human-Diseases. *Journal of the Royal Society of Health* **111**: 172-177.

Anonym (u.å.). Legemiddelsiden.

<http://www.legemiddelsiden.no/default.aspx?repid=0&PageID=66&IOID=2460&editionid=11833&texttypeid=2&languageid=0> 05.07.07.

Anonym (2006). Godkjente naturlegemidler.

http://www.legemiddelverket.no/templates/InterPage_19120.aspx 08.08.07.

Anonym (2007a). Forskrift om legemiddelklassifisering (legemiddellisten, unntakslisten og urtelisten). <http://www.lovdato.no/cgi-wift/ldles?doc=/sf/sf/sf-19991227-1565.html> 14.08.07.

Bastard, J., Duc, D. K. og Fetizon, M. (1984). CMR Spectroscopy of labdanic diterpenes and related substances. *Journal of Natural Products* **47**: 592-599.

Breitbart, H., Shalev, Y., Marcus, S. og Shemesh, M. (1995). Modulation of prostaglandin synthesis in mammalian sperm acrosome reaction. *Human Reproduction* **10**: 2079-2084.

Bruice, P. Y. (1998). *Organic Chemistry*. Upper Saddle River, Prentice-Hall.

Buhler, D. R. og Miranda, C. (2000). Antioxidant Activities of Flavonoids. <http://lpi.oregonstate.edu/f-w00/flavonoid.html> 04.06.2007.

Dar, P., Strassburger, D., Shaish, A., Levkovitz, H., Halperin, R. og Harats, D. (2001). Reduced reproduction with increased abortion rate in transgenic mice that overexpress 15-lipoxygenase. *Gynecologic and Obstetric Investigation* **52**: 18-21.

Devasagayam, T.P.A, Tilak, J.C, Boloor, K.K, Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S og Lele, R.D (2004). Free radicals and antioxidants in human health; Current status and future prospects. *Journal of The Association of Physicians of India* **52**: 794-804.

Ford-Hutchinson, A. W. (1991). Arachidonate 15-lipoxygenase; characteristics and potential biological significance. *Eicosanoids* **4**: 65-74.

Gardner, H. W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* **1084**: 221-239.

Gleason, M. M., Rojas, C. J., Learn, K. S., Perrone, M. H. og Bilder, G. E. (1995). Characterization and inhibition of 15-lipoxygenase in human monocytes: comparison with soybean 15-lipoxygenase. **268**: C1301-1307.

Gutteridge, J. M. C. og Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends in Biochemical Sciences* **15**: 129-135.

Haining, J. L. og Axelrod, B. (1958). Induction period in the lipoxidase-catalyzed oxidation of linoleic acid and its abolition by substrate peroxide. *Journal of Biological Chemistry* **232**: 193-202.

Halliwell, B. (1993). The Role of Oxygen Radicals in Human Disease, with Particular Reference to the Vascular System. *Haemostasis* **23**: 118-126.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *The Lancet* **344**: 721-724.

Halliwell, B. (2005). Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. <http://www.els.net> 02.05.07

Halliwell, B. og Gutteridge, J.M.C. (1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Molecular Aspects of Medicine* **8**: 89-193.

Halliwell, B. og Gutteridge, J.M.C (1992). Free Radicals, Antioxidants, and Human Disease - Where Are We Now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **119**: 598-620.

Kelavkar, U. P., Cohen, C., Kamitani, H., Eling, T. E. og Badr, K. F. (2000). Concordant induction of 15-lipoxygenase-1 and mutant p53 expression in human prostate adenocarcinoma: correlation with Gleason staging. *Carcinogenesis* **21**: 1777-1787.

Kelavkar, U. P., Nixon, J. B., Cohen, C., Dillehay, D., Eling, T. E. og Badr, K. F. (2001). Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in PC-3 human prostate cancer cells increases tumorigenesis. *Carcinogenesis* **22**: 1765-1773.

Lyckander, I. M. og Malterud, K. E. (1996). Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* prevent oxidative inactivation of 15-lipoxygenase. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* **54**: 239-246.

Malterud, K.E. (1998). Flavonoider og helse. *Norges Apotekerforenings Tidsskrift* **106** (4): 10-16.

Malterud, K.E (2007). Flavonoider, Bioflavonoider, Rutin. NONA. <http://www.nona.no> 02.05.07

Malterud, K. E., Rydland, K. M. og Haugli, T. (1999). Inhibition of 15-lipoxygenase by Phthalate Plasticizers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **62**: 352-355.

Meltzer, H.M. og Malterud, K.E (1997). Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scandinavian Journal of Nutrition* **41**: 50-57.

Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **26**: 211-219.

Perry, N. B., Baxter, A. J., N.J., B., Klink, J. v., McGimpsey, J. A., Douglas, M. H. og Joulain, D. (1996). Dalmatian Sage. Part 1. Differing Oil Yields and Compositions from Flowering and Non-Flowering Accessions. *Flavour and Fragrance Journal* **11**: 231-238.

Rang, H. P., Dale, M. M. og Ritter, J. M. (1999). Pharmacology. Edinburgh, Churchill Livingstone: 4. utg.:213-220.

Sendobry, S. M., Cornicelli, J. A., Welch, K., Bocan, T., Tait, B., Trivedi, B. K., Colbry, N., Dyer, R. D., Feinmark, S. J. og Daugherty, A. (1997). Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *British Journal of Pharmacology* **120**: 1199-1206.

Sies, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. *The American Journal of Medicine* **91**: S31-S38.

Sigma-Aldrich (2007). VersaFlash.

http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/VersaFlash_splash_page.html 30.03.07.

Stahl, V. og Sies, H. (1997). Antioxidant defense: Vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* **46**: S14-S18.

Steinberg, D. (1999). At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis. *Journal of Clinical Investigation* **103**: 1487-1488.

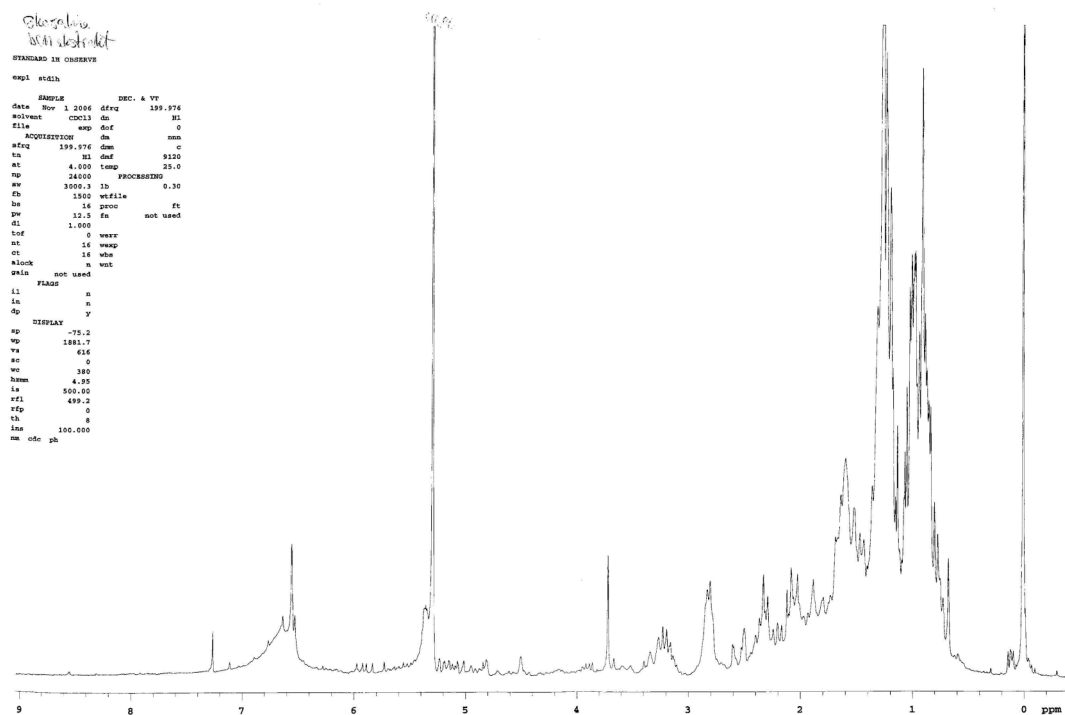
Sæther, P. A. (1999). Radikalscavengere og antioksidanter fra rogneved - Hovedfagsoppgave. Oslo: Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Thiagarajah, K., Liljebäck, T. H. A. og Malterud, K. E. (2005). Salvie i butikken og økologisk dyrket salvie - er det noen forskjell? Abstract P16, Farmasidagene, Oslo.

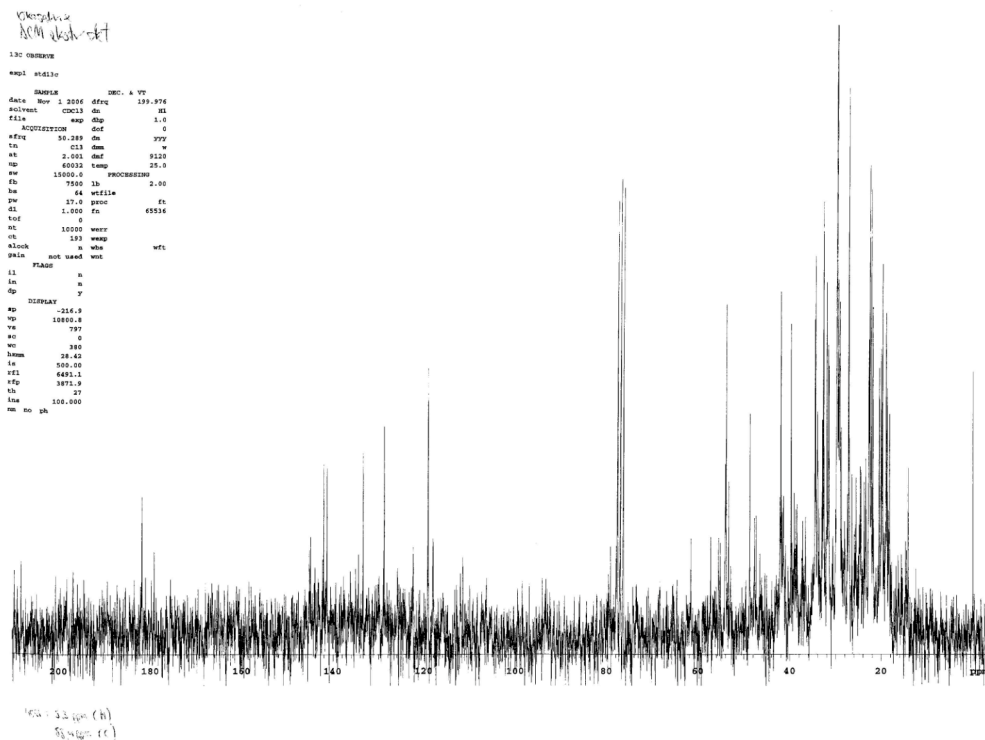
Velickovic, D. T., Randjelovic, N. V., Ristic, M. S., Velickovic, A. S. og Smelcerovic, A. A. (2003a). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. *Journal of the Serbian Chemical Society* **68**: 17-24.

Vedlegg

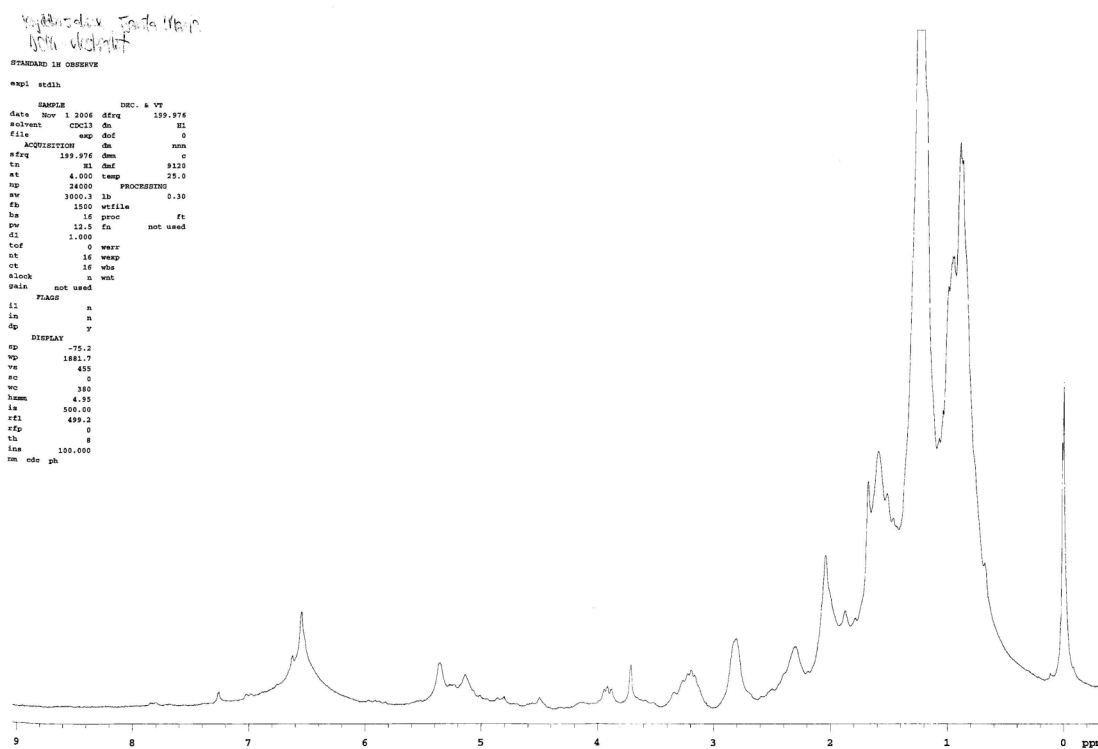
Vedlegg 1: ^1H -NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



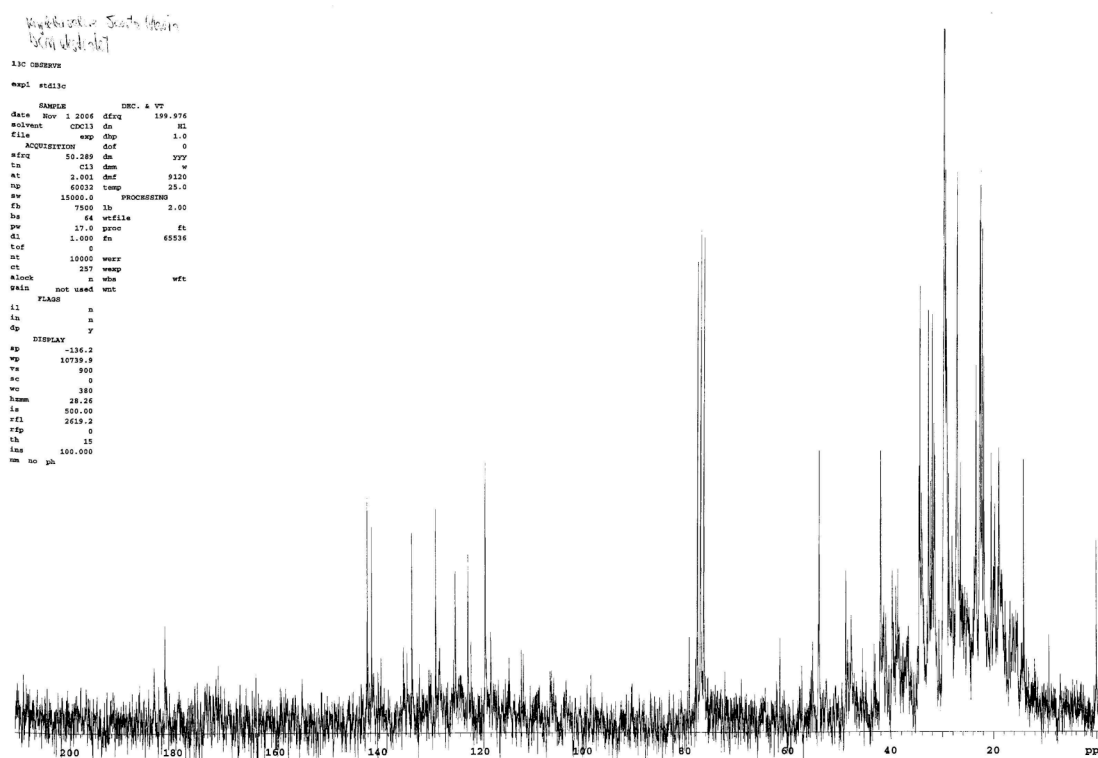
Vedlegg 2: ^{13}C -NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



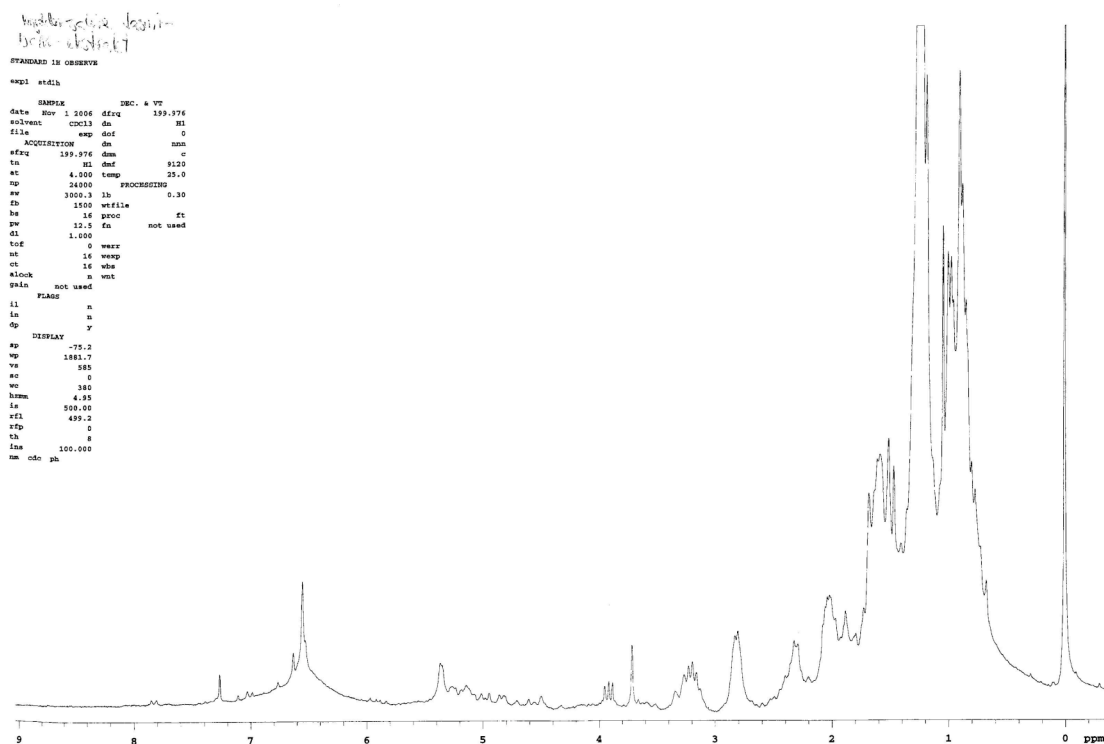
Vedlegg 3: ^1H -NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av kryddersalvie fra "Santa Maria".



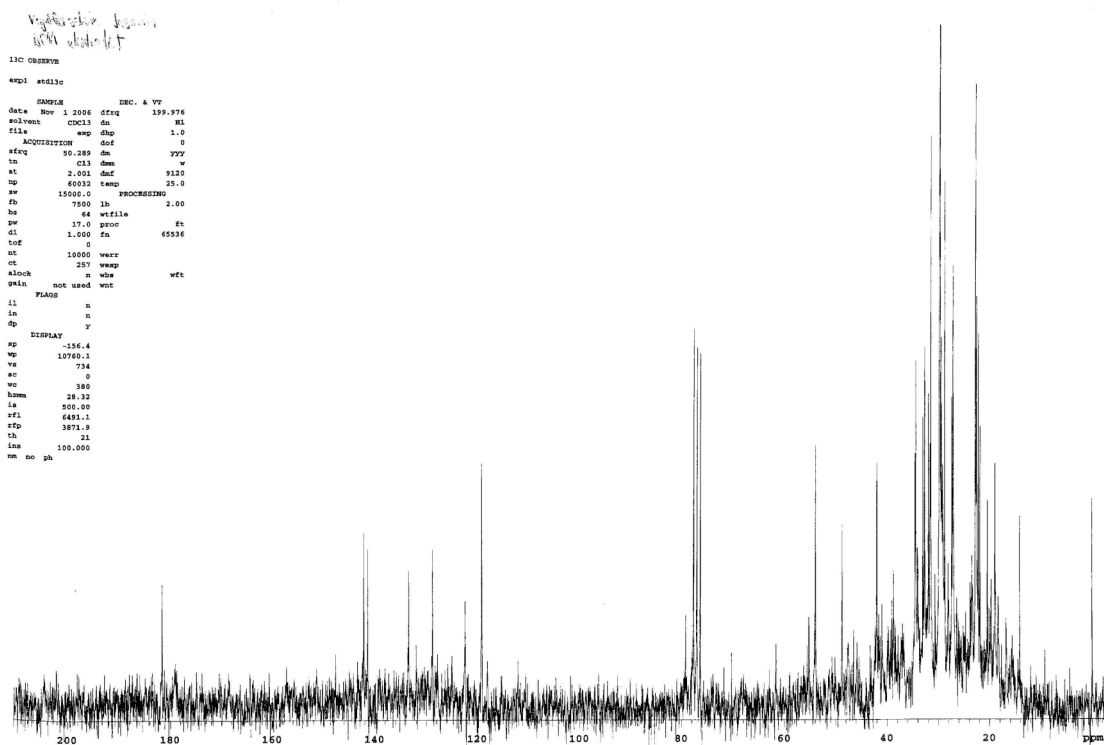
Vedlegg 4: ^{13}C -NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av kryddersalvie fra "Santa Maria".



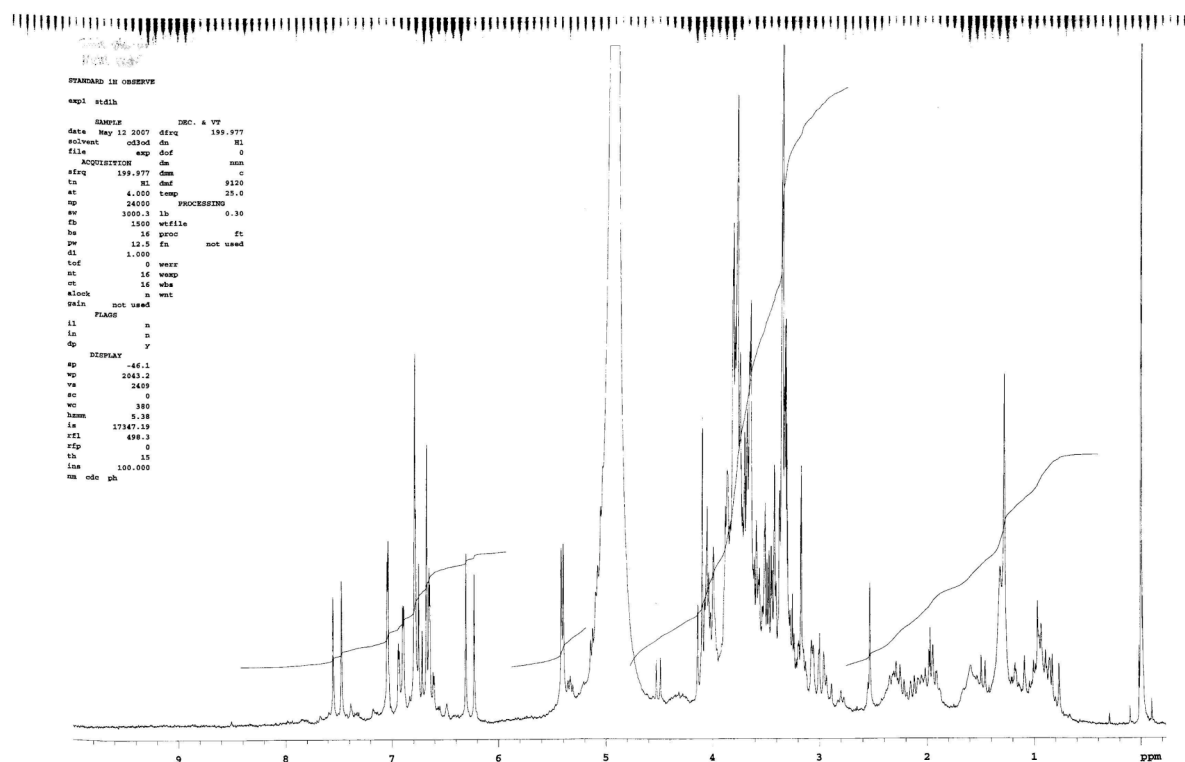
Vedlegg 5: ^1H -NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av kryddersalvie fra "Jasmin".



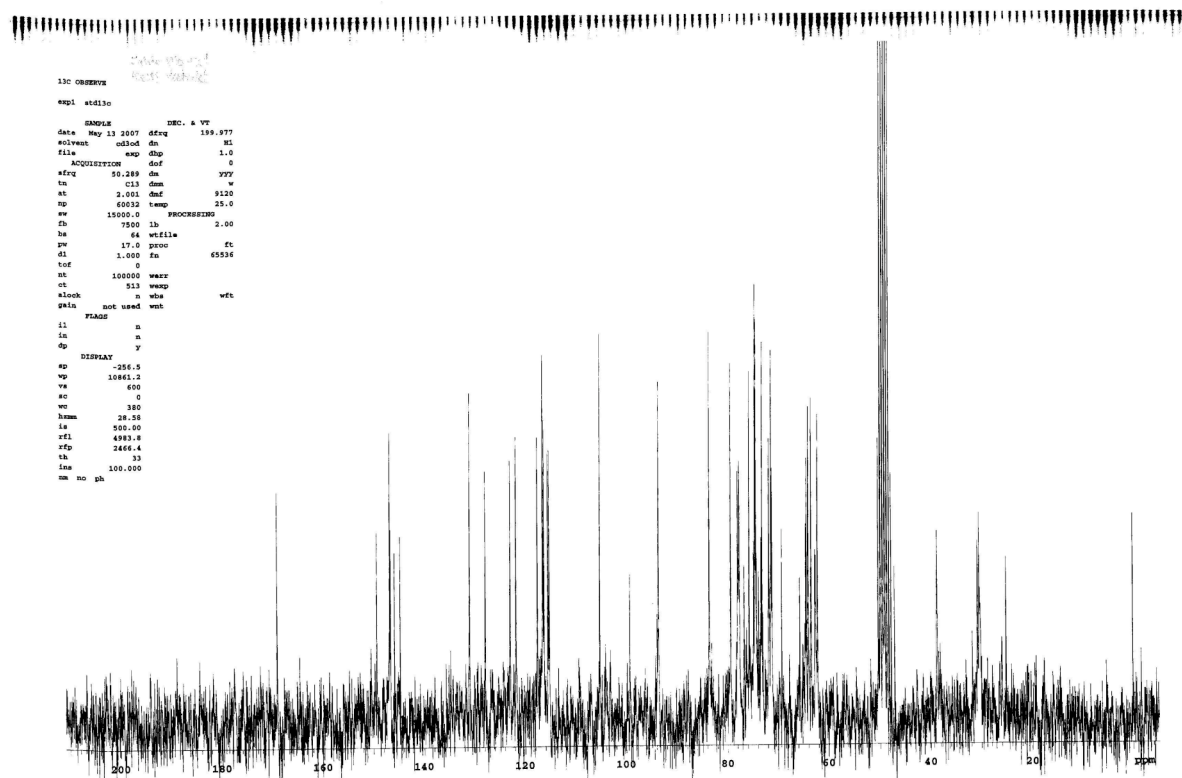
Vedlegg 6: ^{13}C -NMR-spektrum av DCM-ekstrakt av kryddersalvie fra "Jasmin".



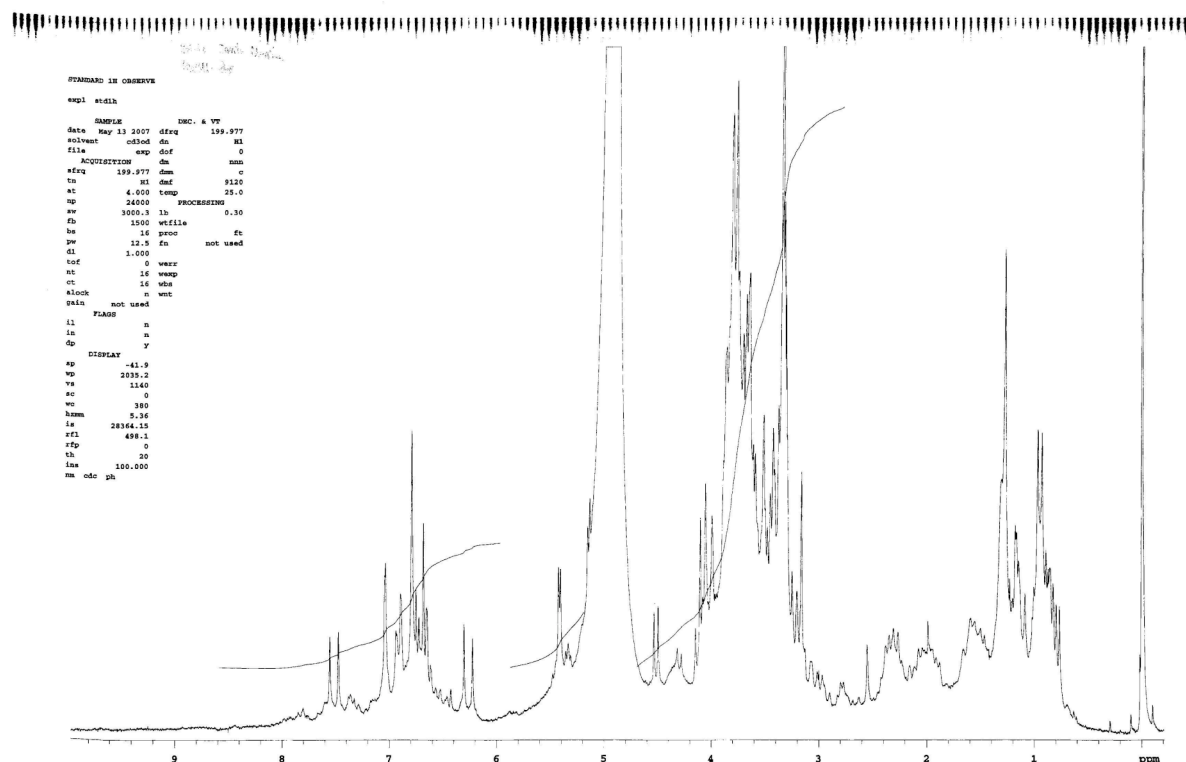
Vedlegg 7: ^1H -NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av økologisk salvie.



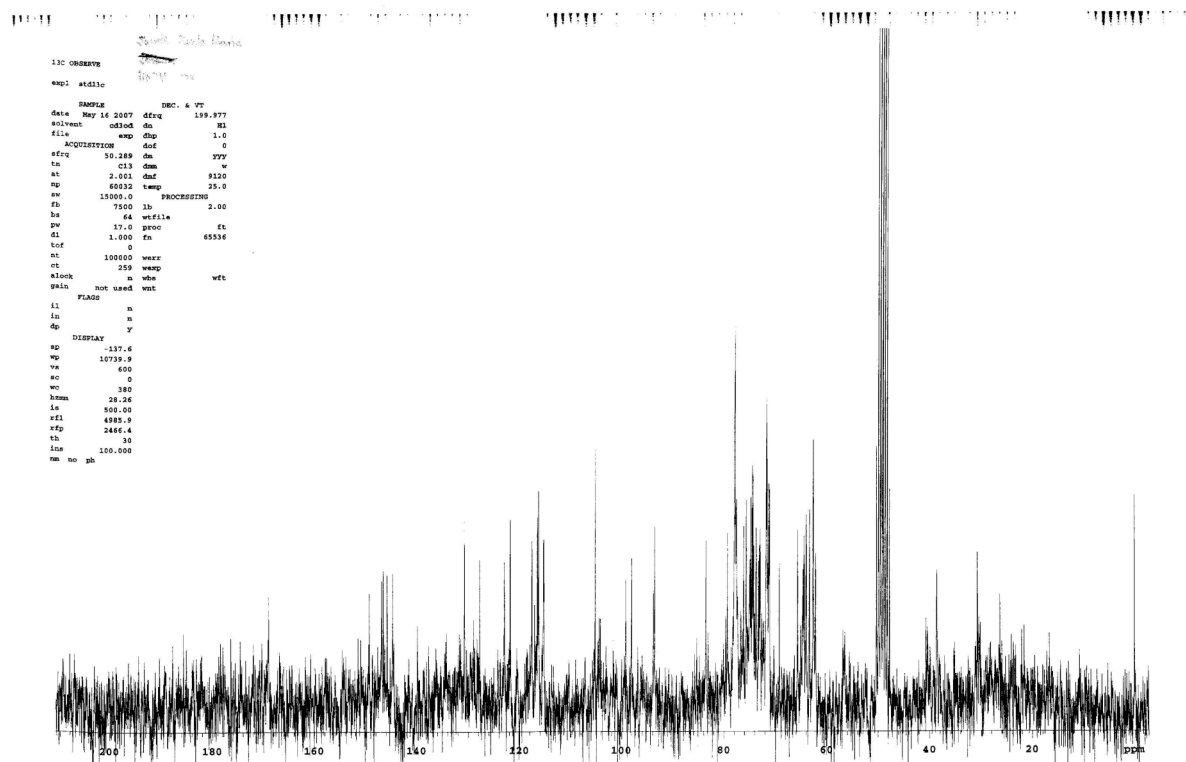
Vedlegg 8: ^{13}C -NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av økologisk salvie.



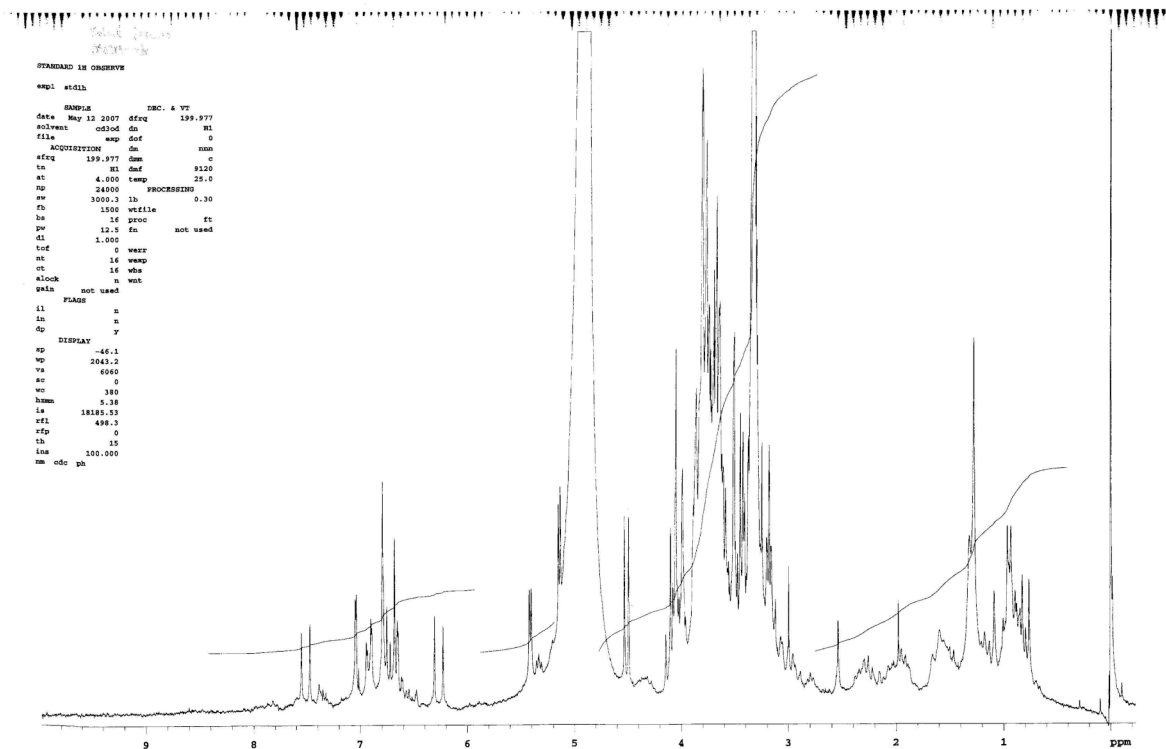
Vedlegg 9: ^1H -NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av kryddersalvie fra "Santa Maria".



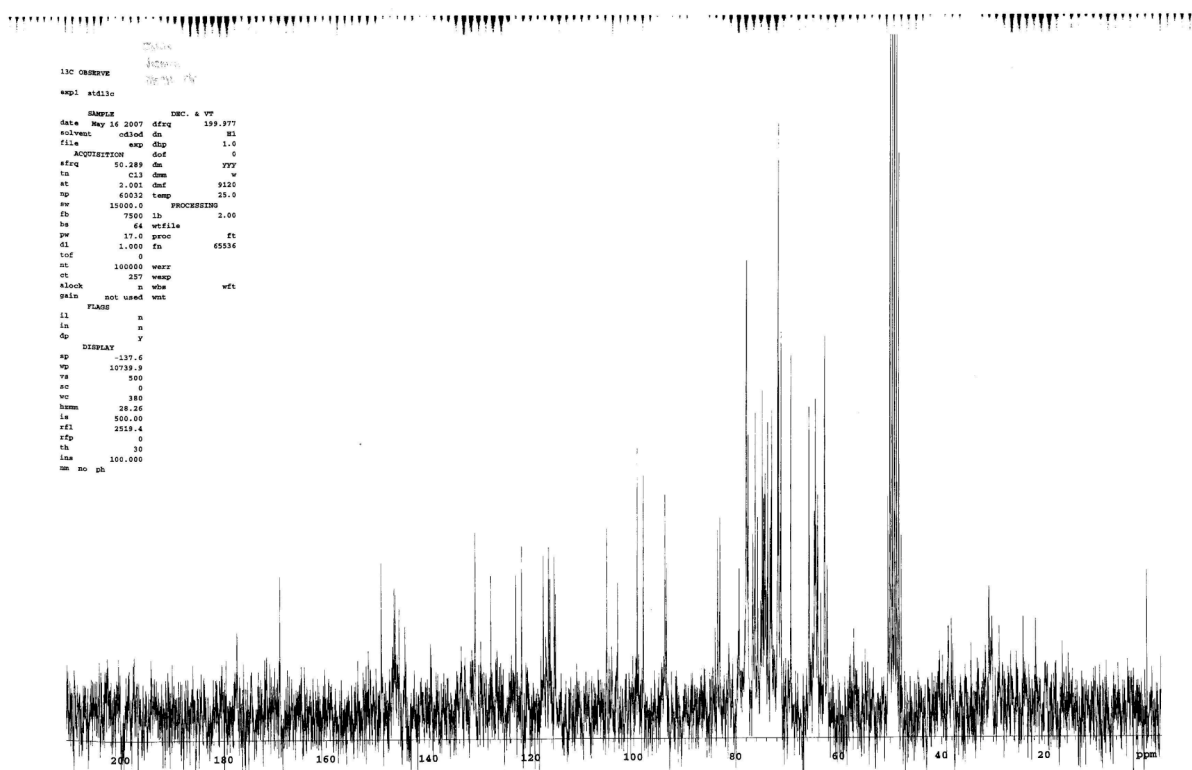
Vedlegg 10: ^{13}C -NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av kryddersalvie fra "Santa Maria".



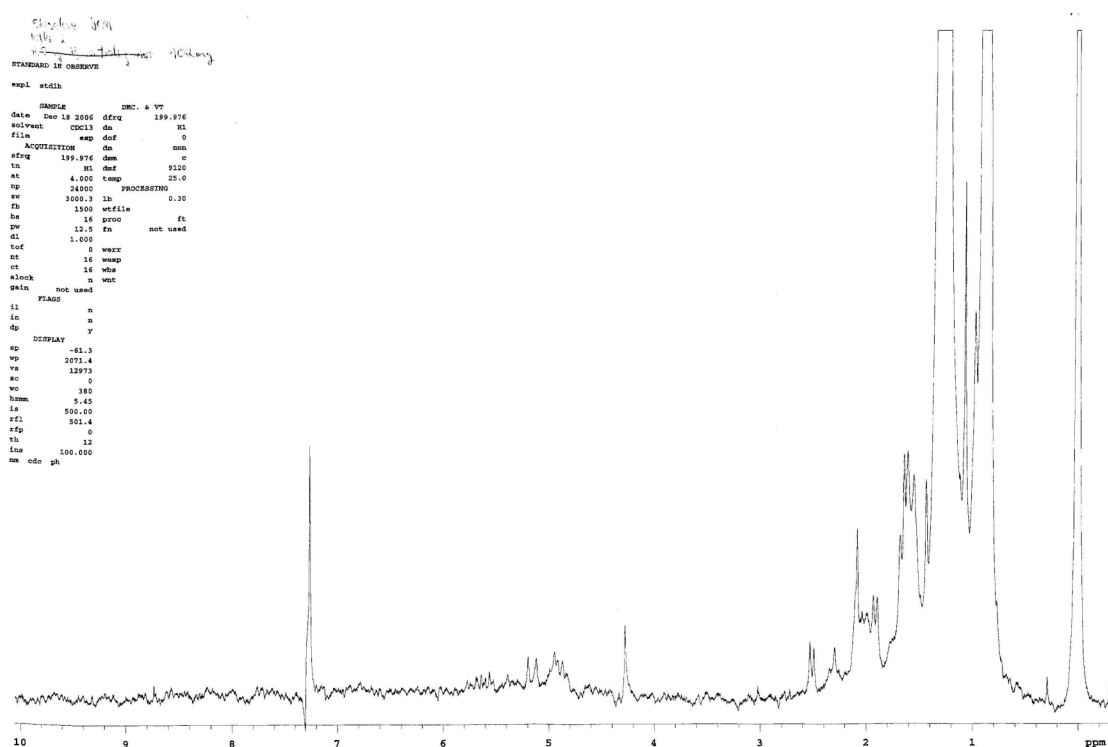
Vedlegg 11: ^1H -NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av kryddersalvie fra "Jasmin".



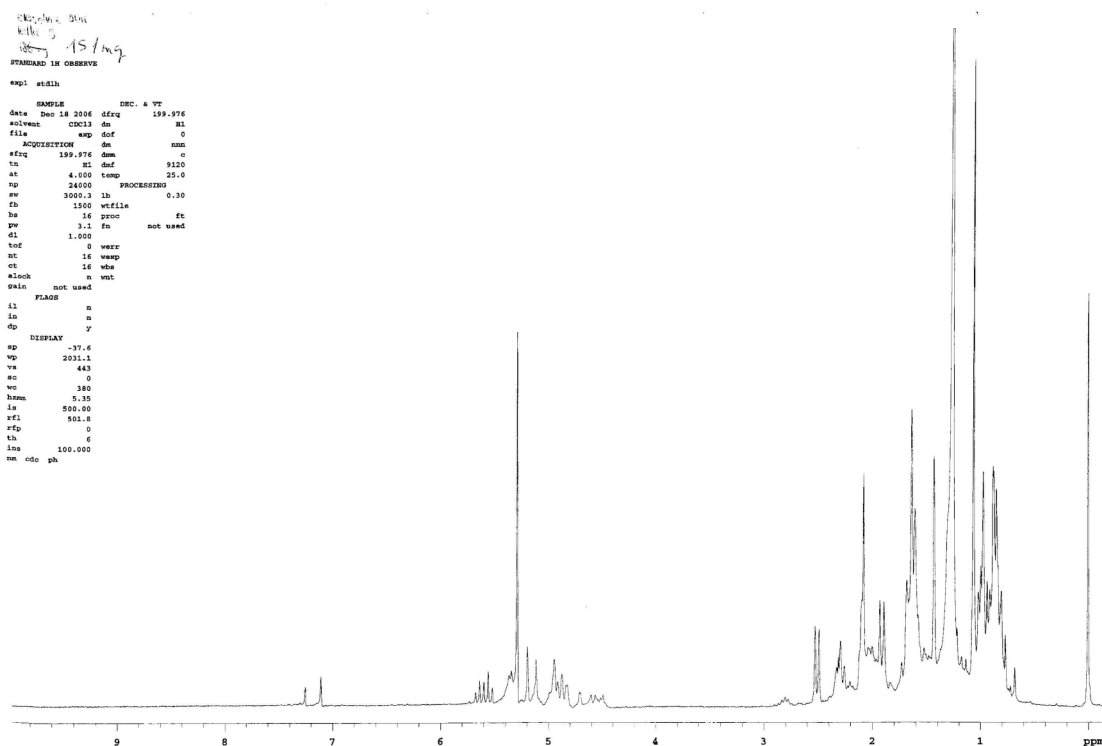
Vedlegg 12: ^{13}C -NMR-spektrum av MeOH-ekstrakt av kryddersalvie fra "Jasmin".



Vedlegg 13: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 2 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



Vedlegg 14: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 3 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



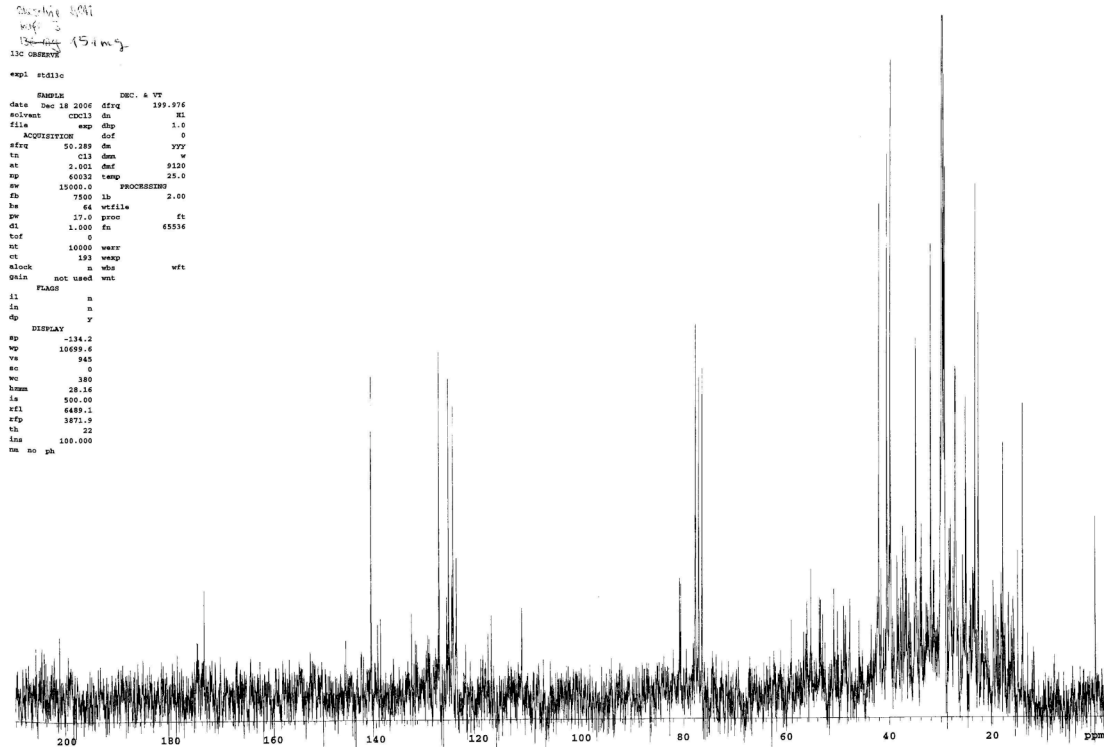
Vedlegg 15: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon 3 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.

Dec 18 2006
154 mg
13C OBSERVE

expt st0110

```

SAMPLE          DEC. & VT
data Dec 18 2006 dfrq 199.976
solvent CDCl3 da 92
file exp dlp 1.0
ACQUISITION dof 0
dfrq 50.285 dm VTY
tn c13 dm w
at 2.001 dmf 9120
sp 60031 temp 25.0
sw 15000.0 PROCESSING
fb 7500 lb 2.00
he 64 wfile
pw 17.0 proc ft
dl 1.000 fn 65536
tof 0
nt 10000 warr
ct 193 wexp
clock n whe wft
spin not used wnt
FLAG
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp -134.3
wp 10699.6
ve 945
eo 0
wc 380
hnm 28.16
ia 500.00
rfi 6489.1
rfp 3871.3
th 22
lma 100.000
na no ph
    
```



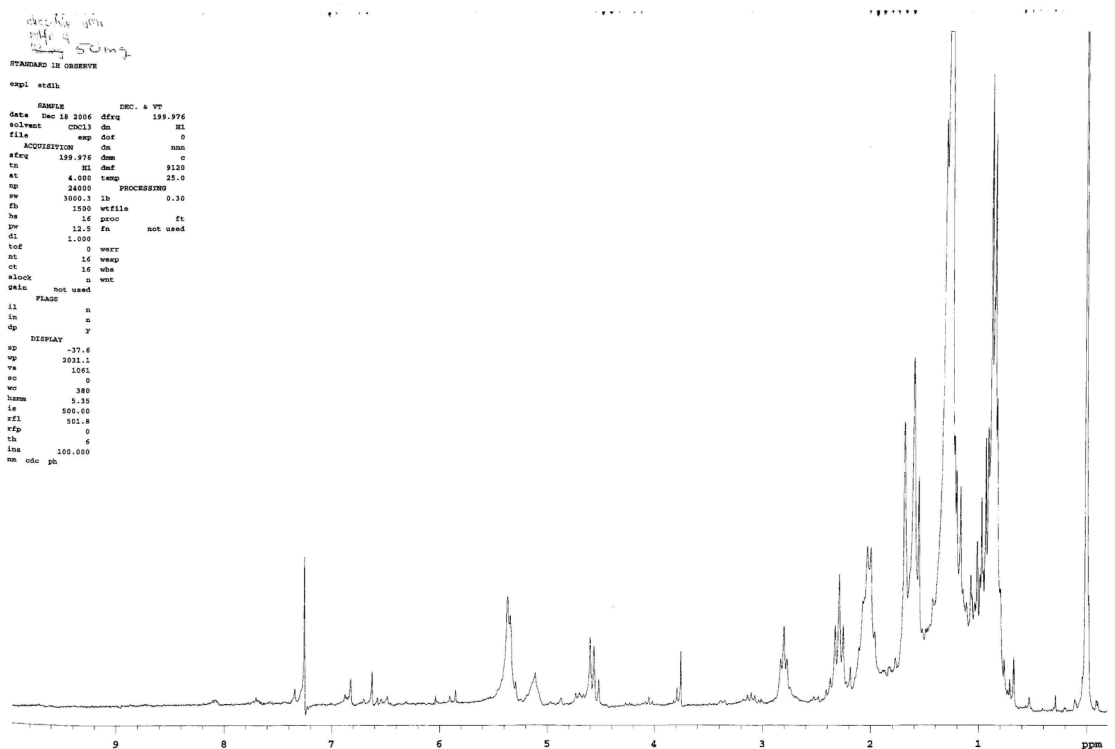
Vedlegg 16: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 4 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.

Dec 18 2006
154 mg
1H OBSERVE

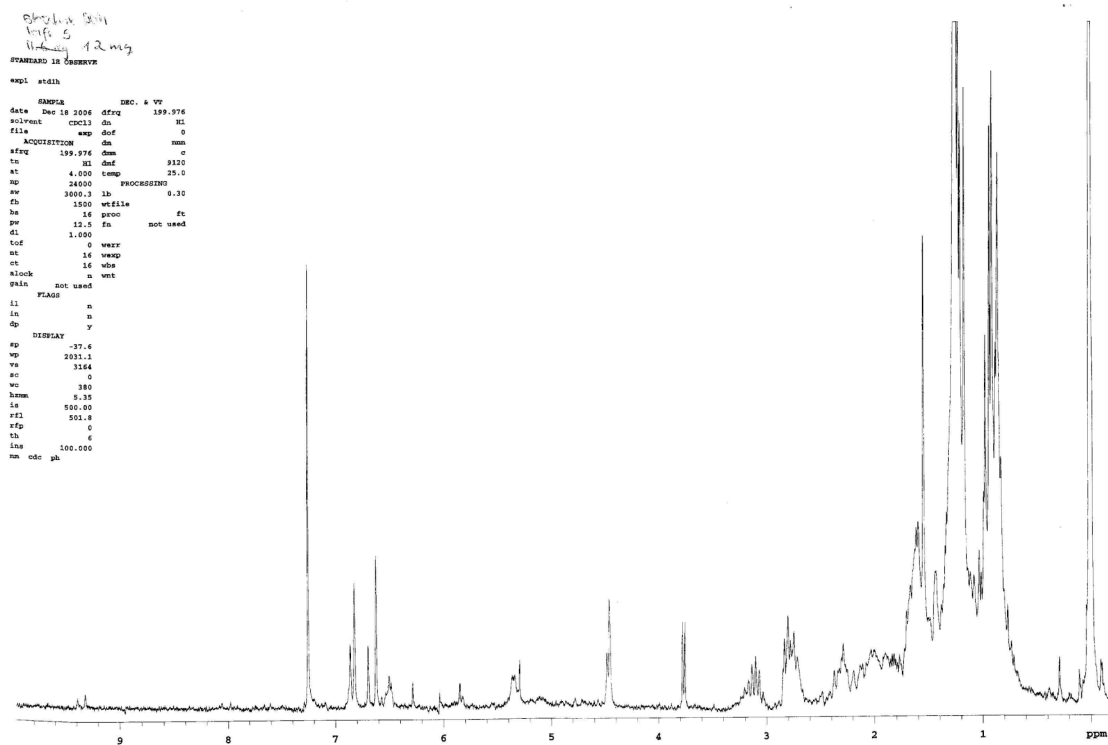
expt st0110

```

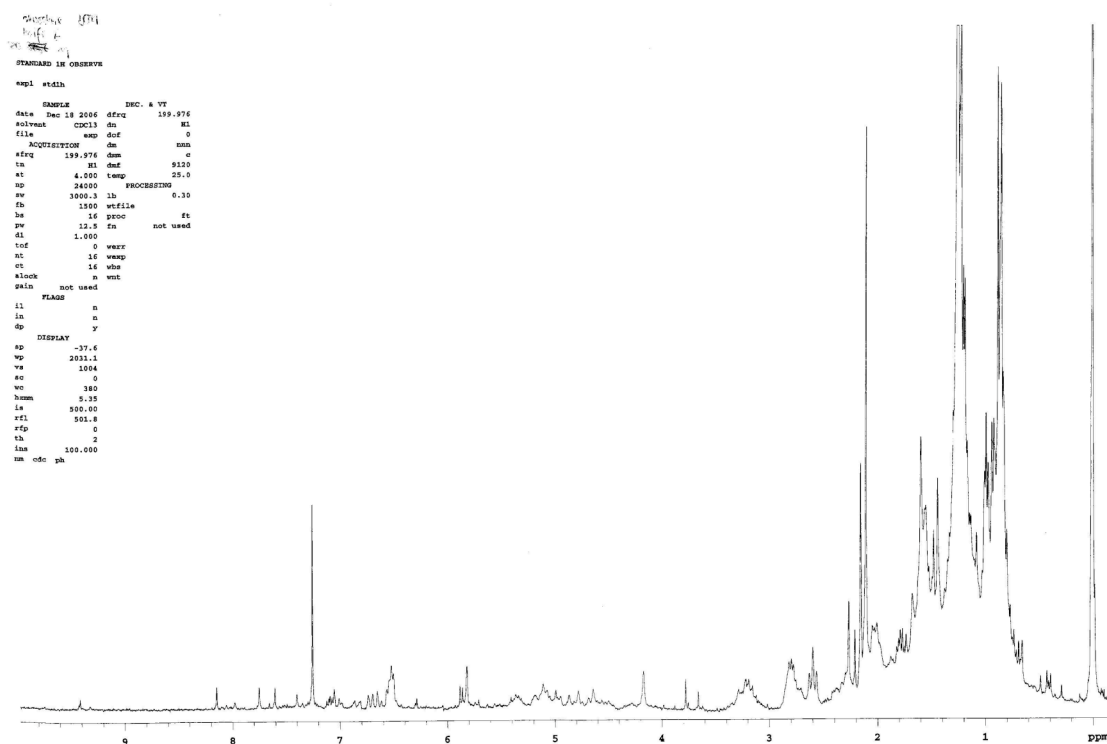
SAMPLE          DEC. & VT
data Dec 18 2006 dfrq 199.976
solvent CDCl3 da 92
file exp dlp 0
ACQUISITION dm nmn
dfrq 199.976 dm o
tn 91 dmf 9120
at 4.000 temp 25.0
sw 24000 PROCESSING
fb 3000.3 lb 0.30
he 1900 wfile
pw 14 proc ft
dl 12.5 fn not used
tof 1.000
nt 0 warr
ct 16 wexp
clock n whe wft
spin not used wnt
FLAG
il n
in n
dp y
DISPLAY
sp -37.6
wp 2031.1
ve 1061
eo 0
wc 380
hnm 6.35
ia 500.00
rfi 501.8
rfp 0
th 6
lma 100.000
na cdo ph
    
```



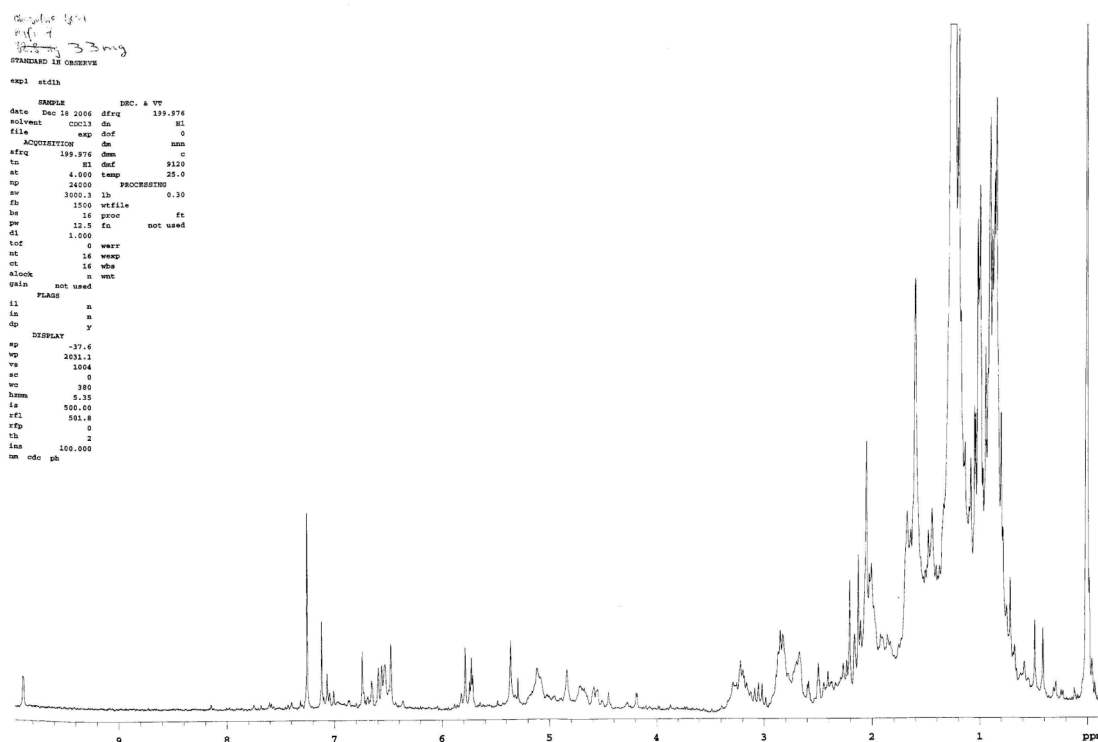
Vedlegg 17: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 5 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



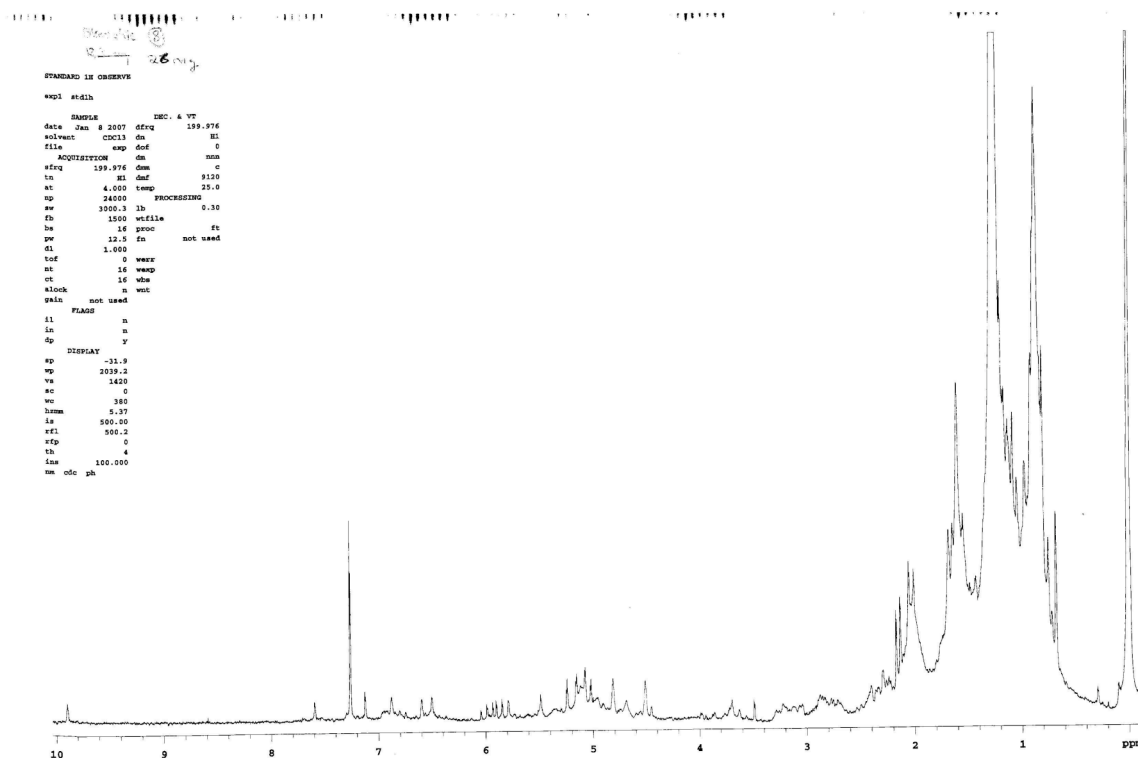
Vedlegg 18: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 6 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



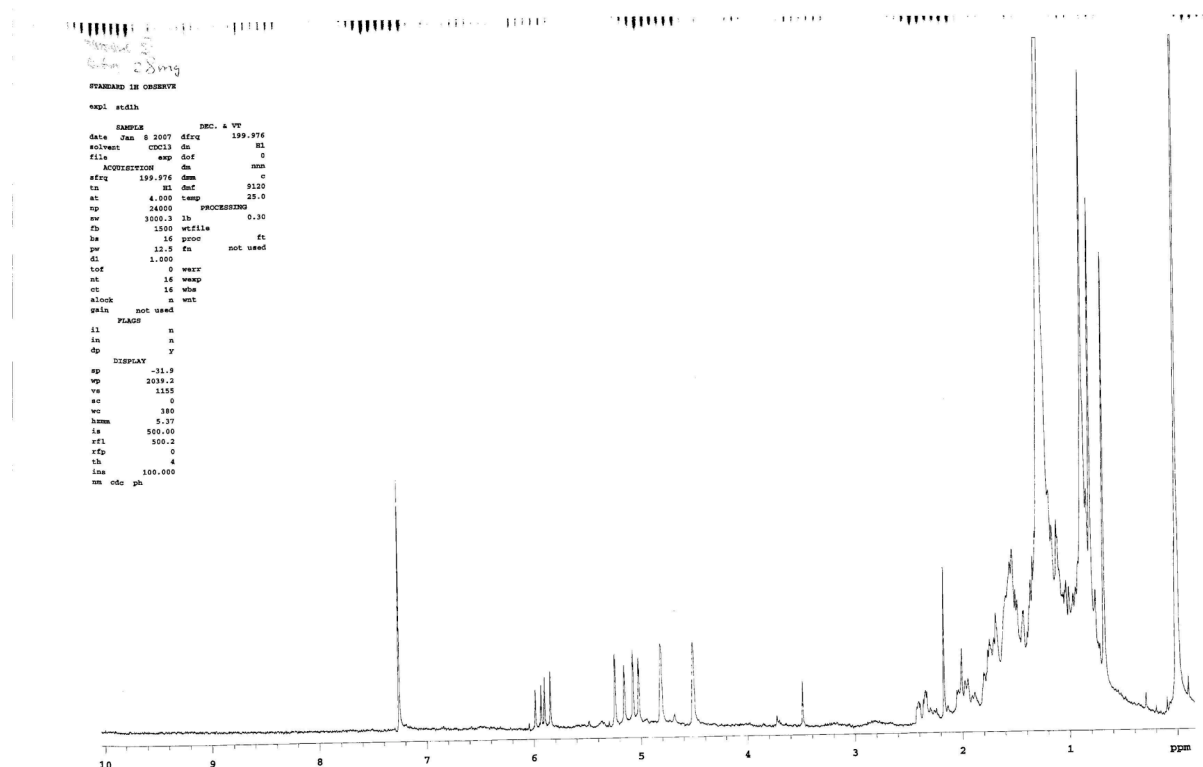
Vedlegg 19: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 7 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



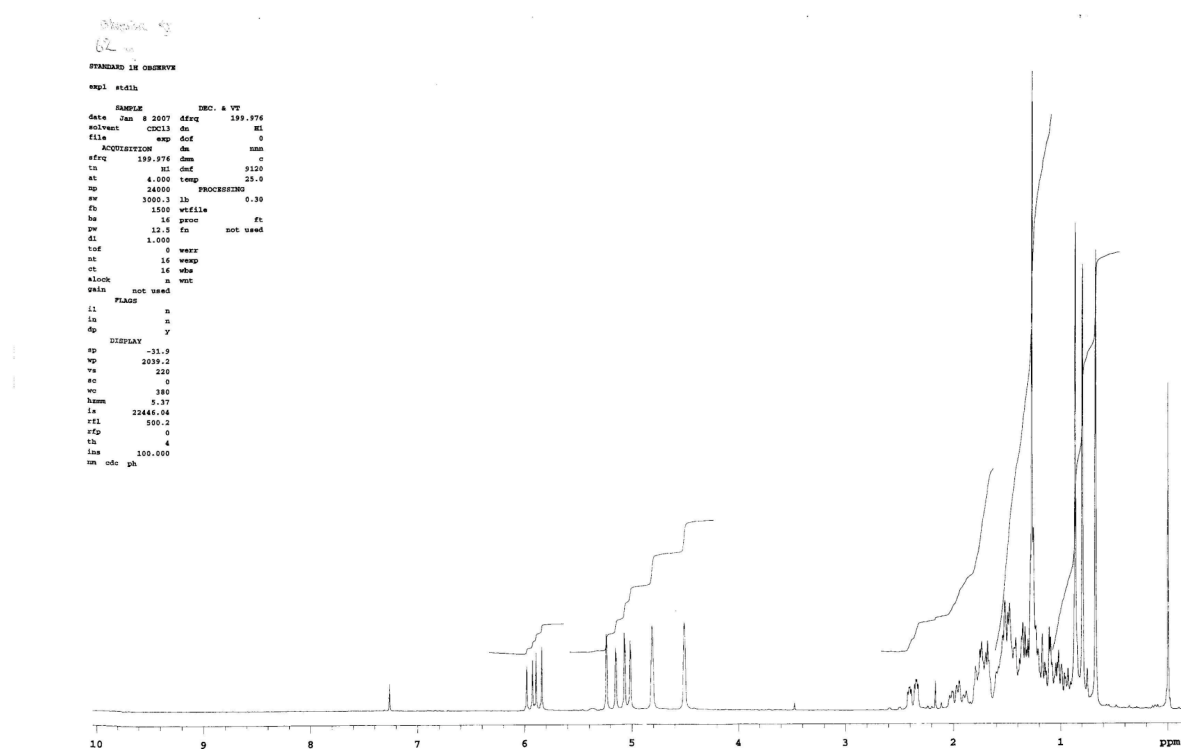
Vedlegg 20: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 8 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



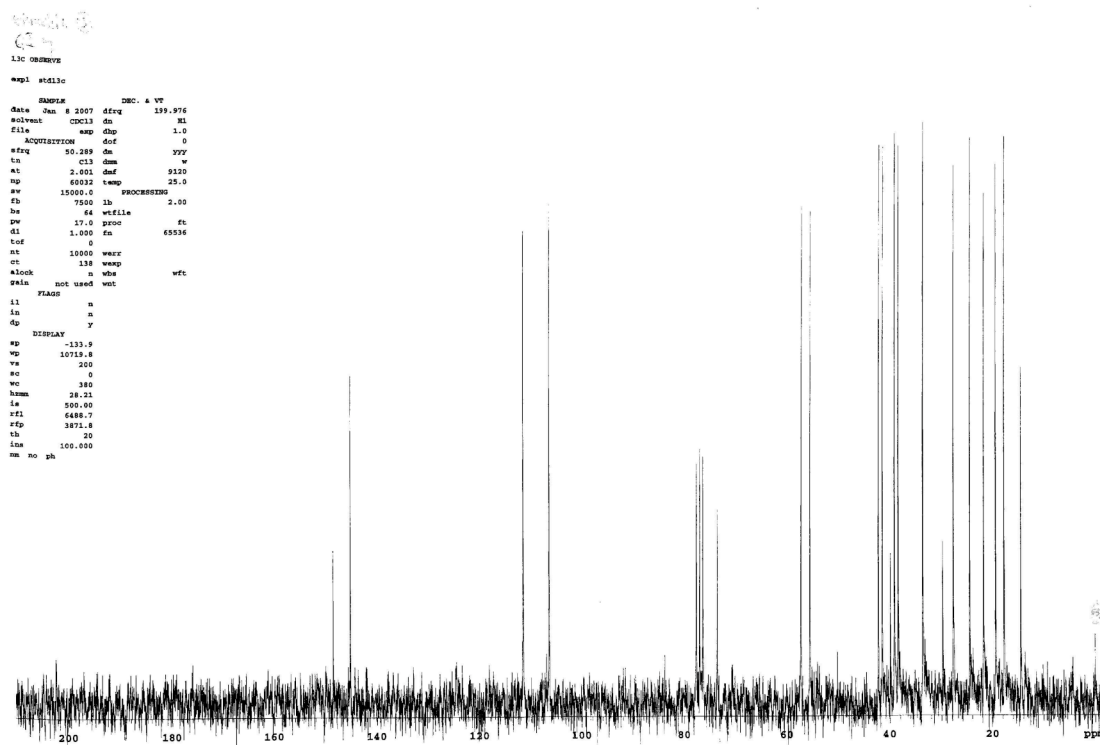
Vedlegg 21: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 9 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



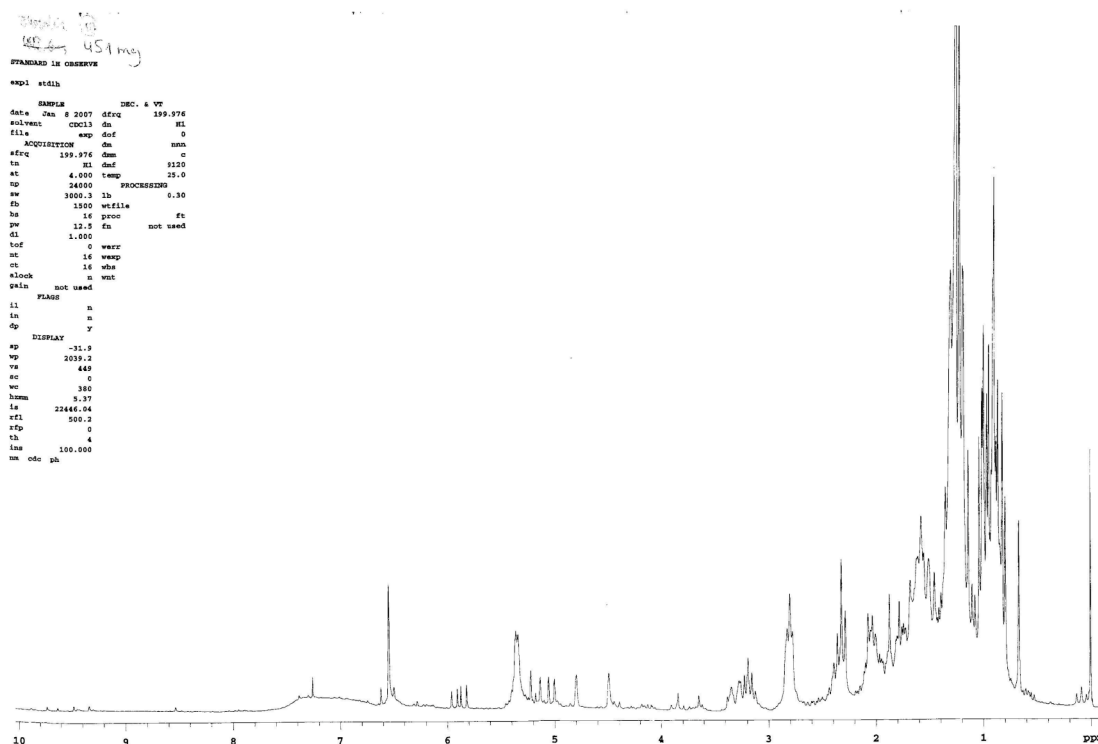
Vedlegg 22: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 10 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



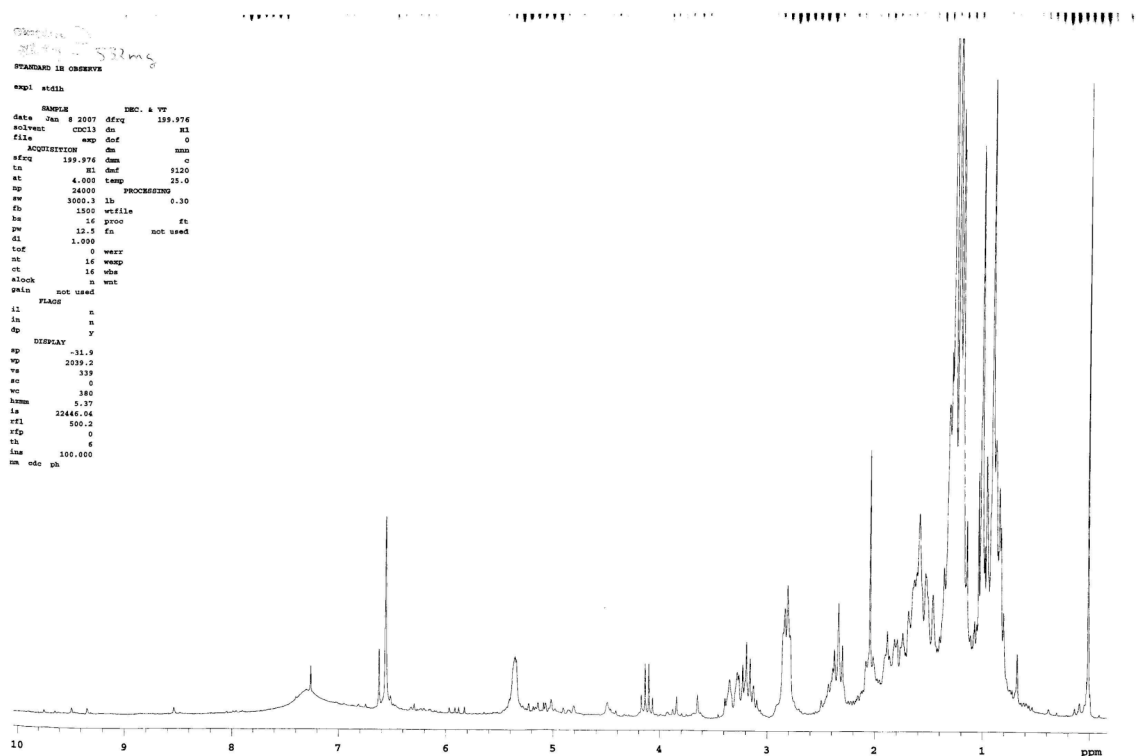
Vedlegg 23: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon 10 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



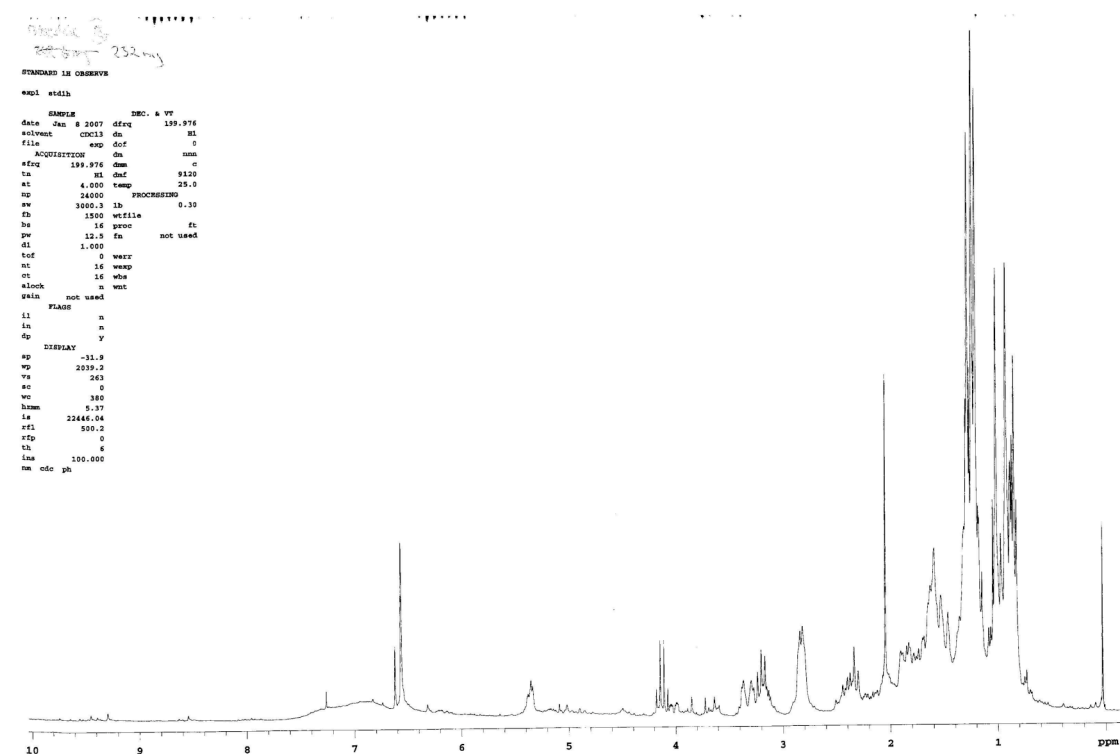
Vedlegg 24: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 11 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



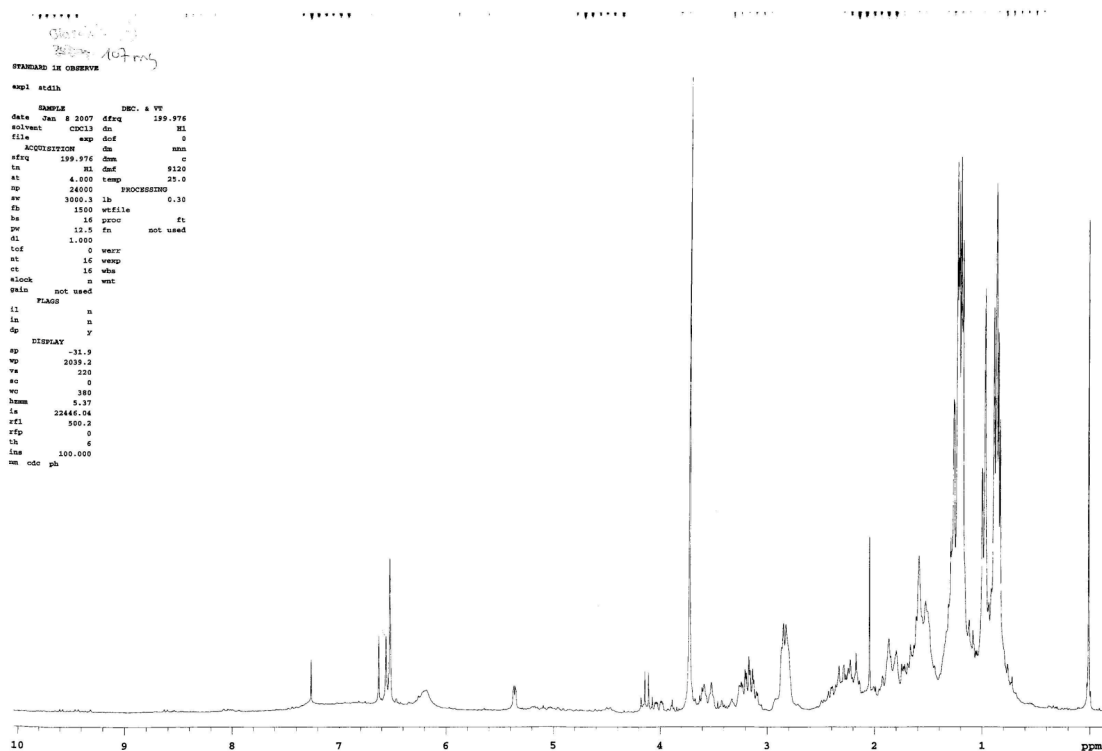
Vedlegg 25: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 12 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



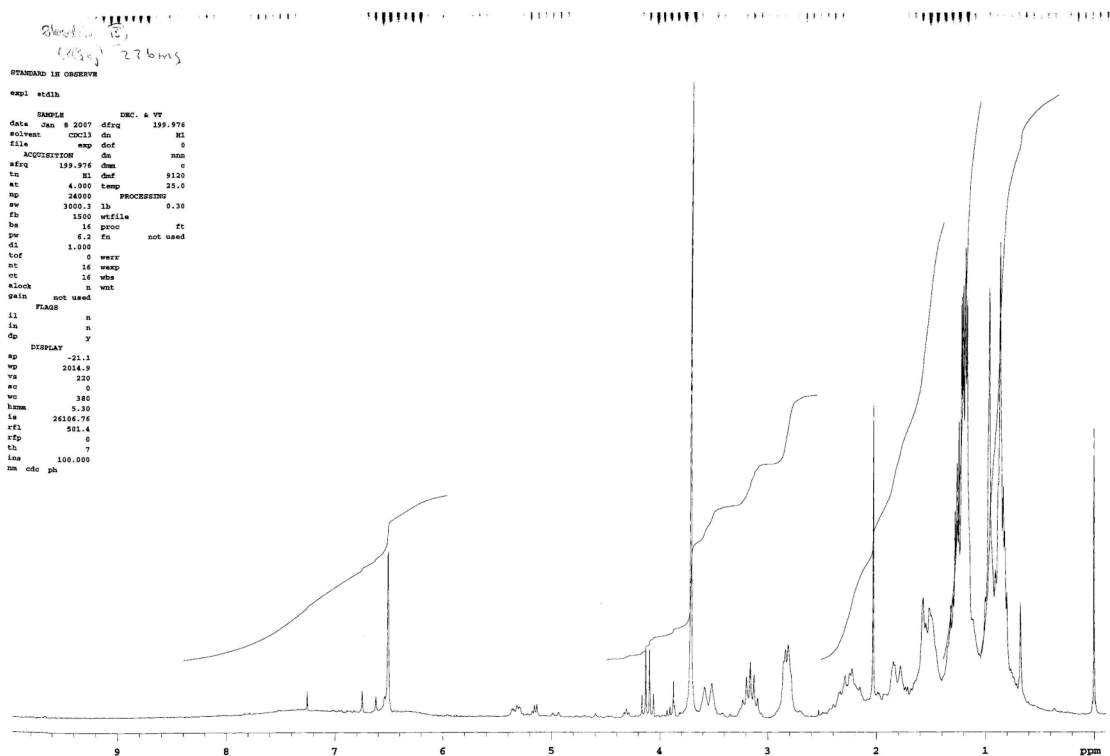
Vedlegg 26: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 13 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



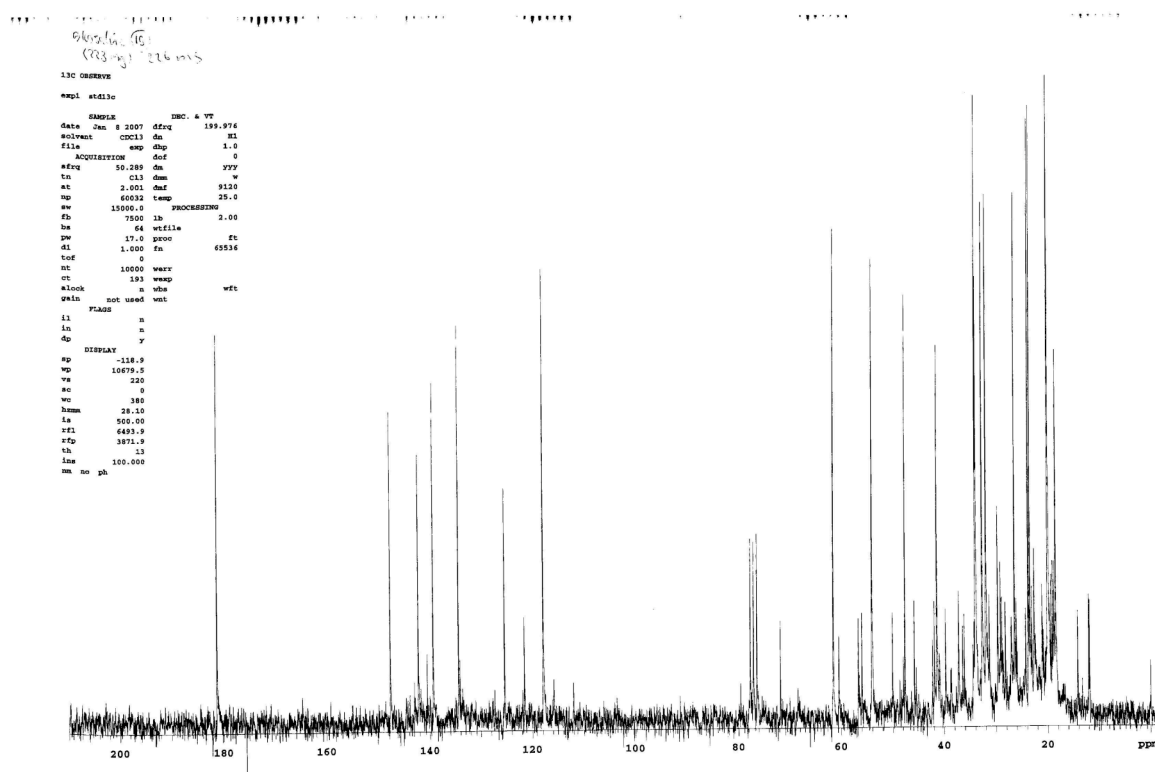
Vedlegg 27: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 14 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



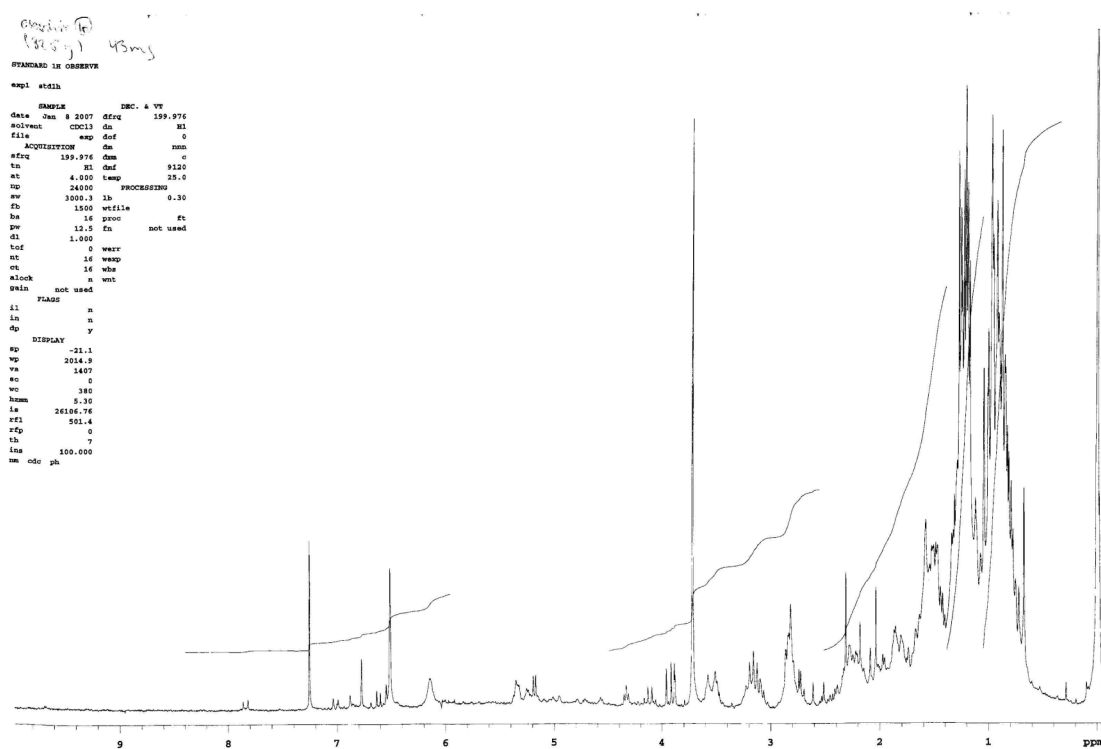
Vedlegg 28: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 15 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



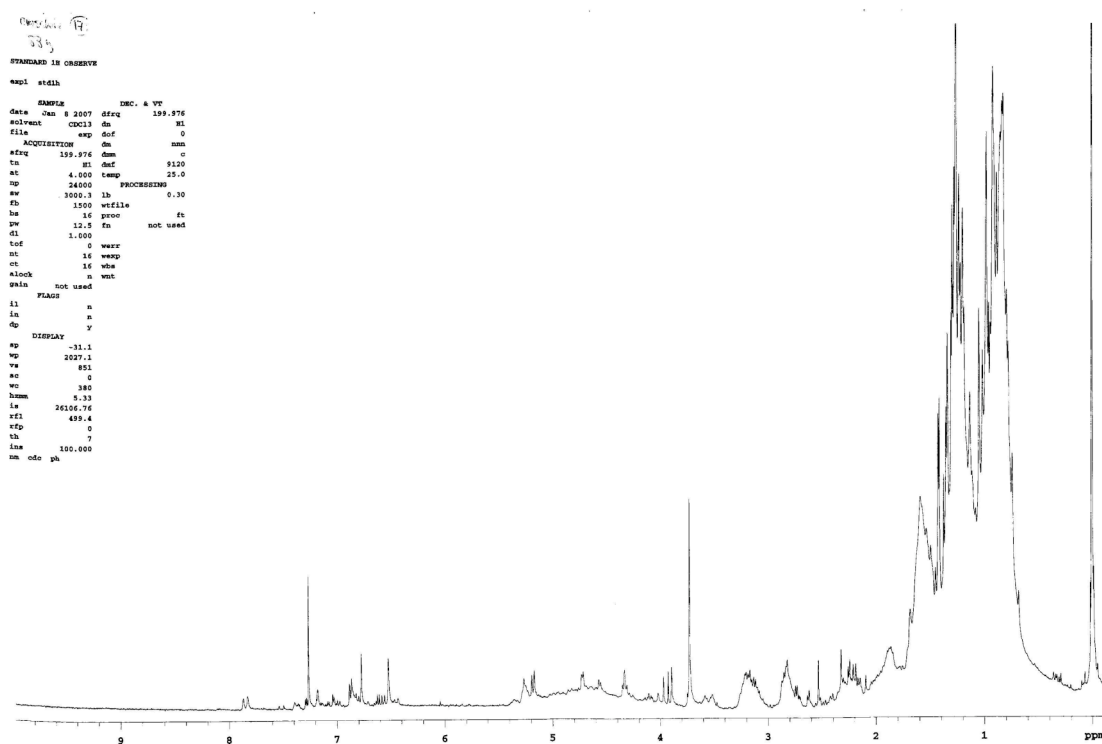
Vedlegg 29: ^{13}C -NMR-spektrum av fraksjon 15 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



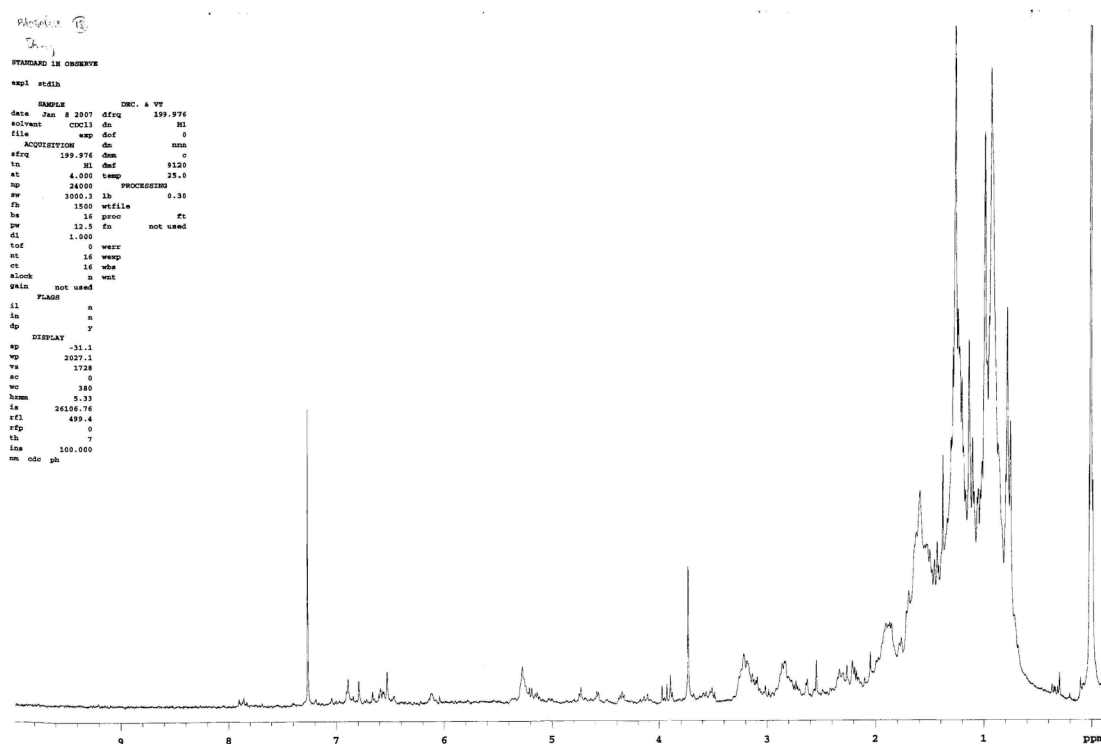
Vedlegg 30: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 16 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



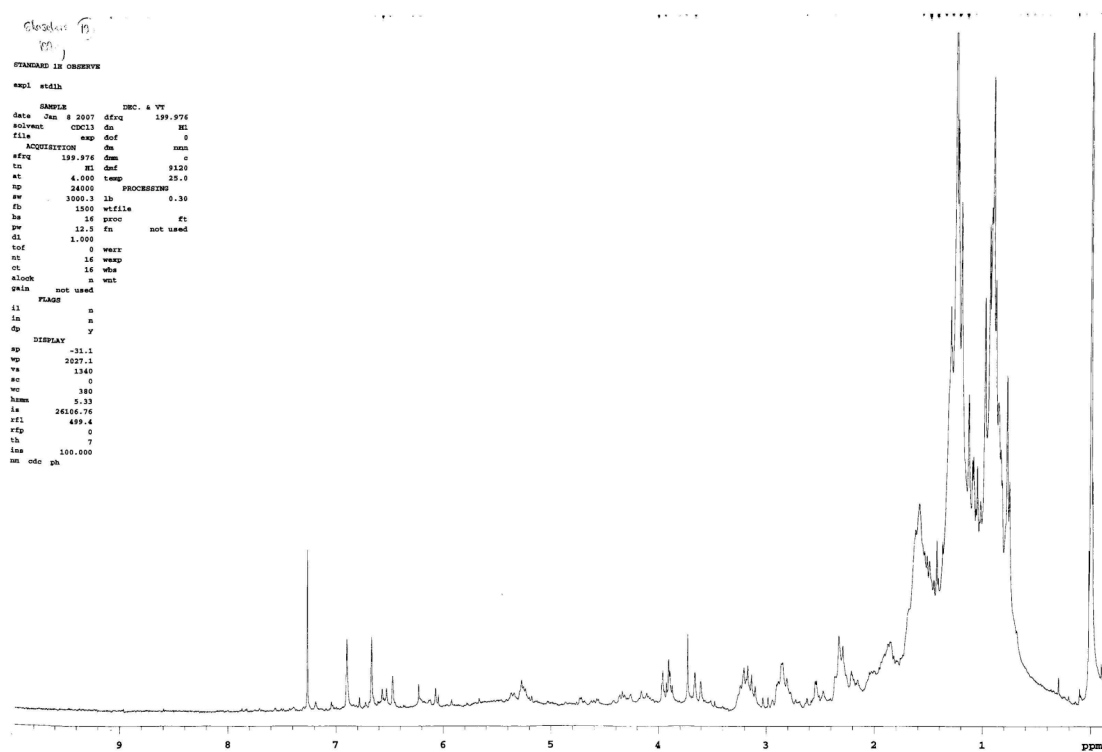
Vedlegg 31: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 17 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



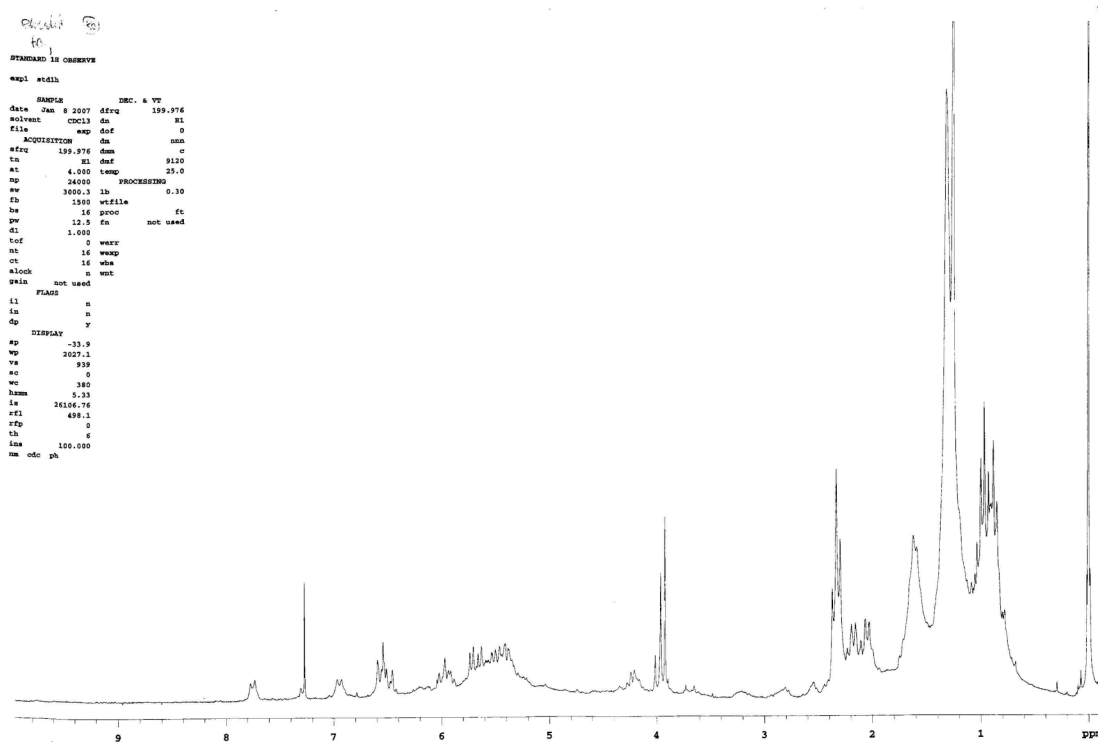
Vedlegg 32: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 18 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



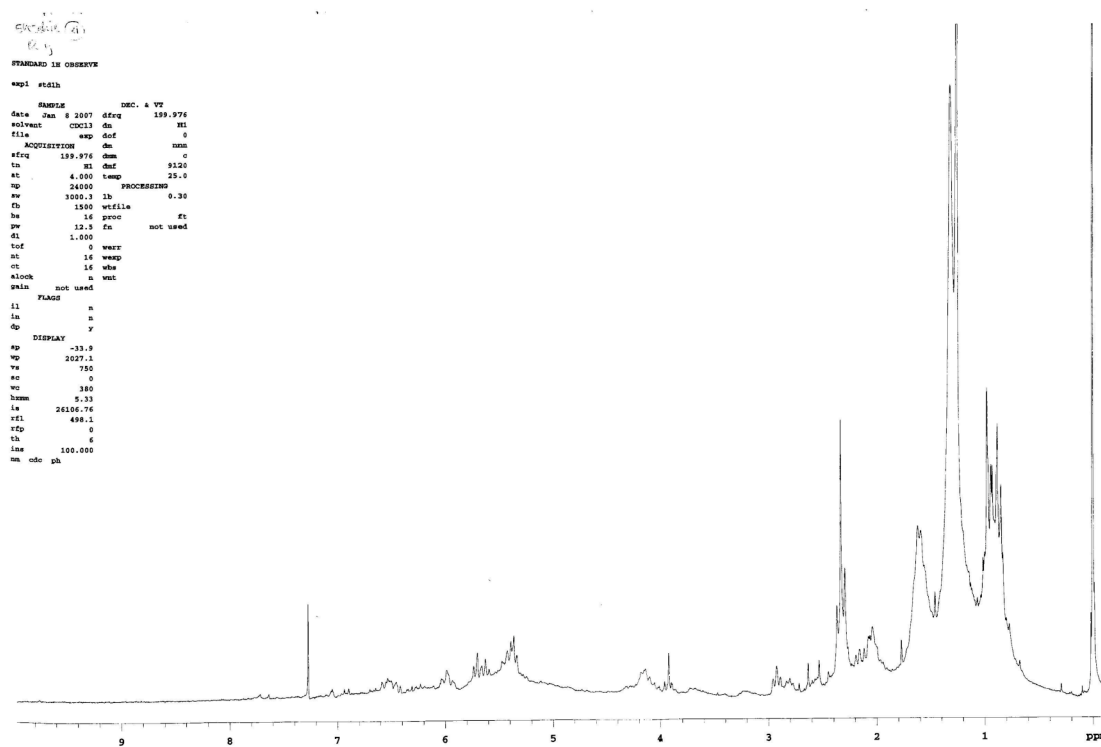
Vedlegg 33: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 19 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



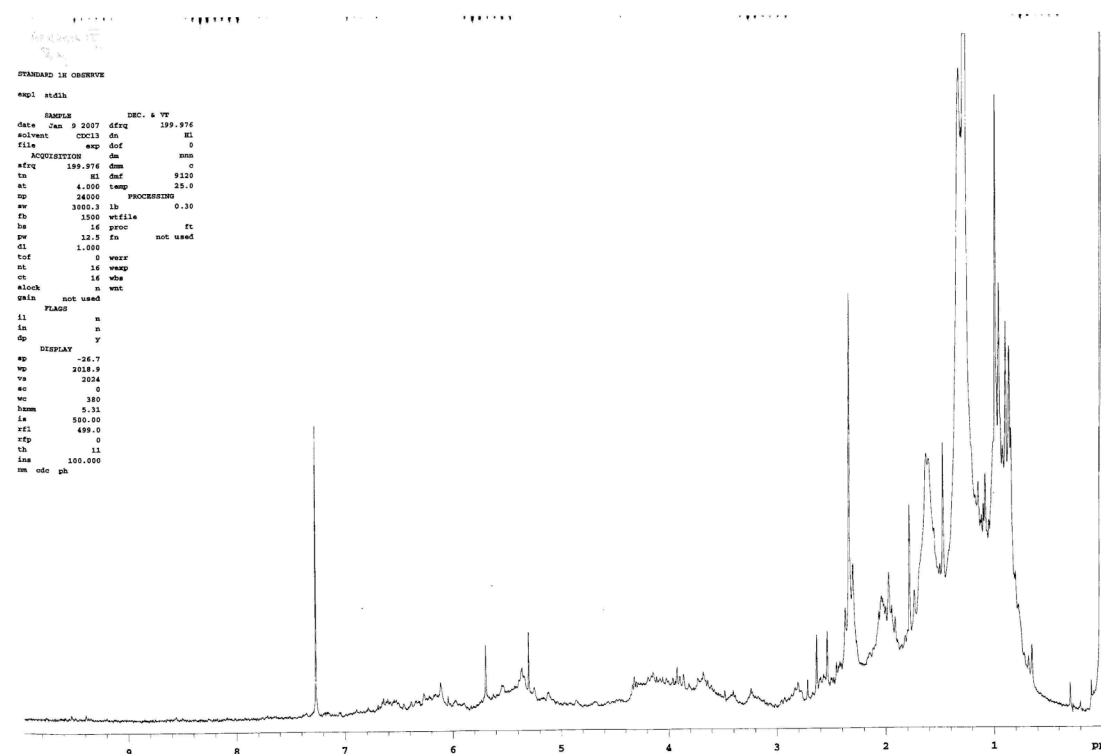
Vedlegg 34: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 20 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



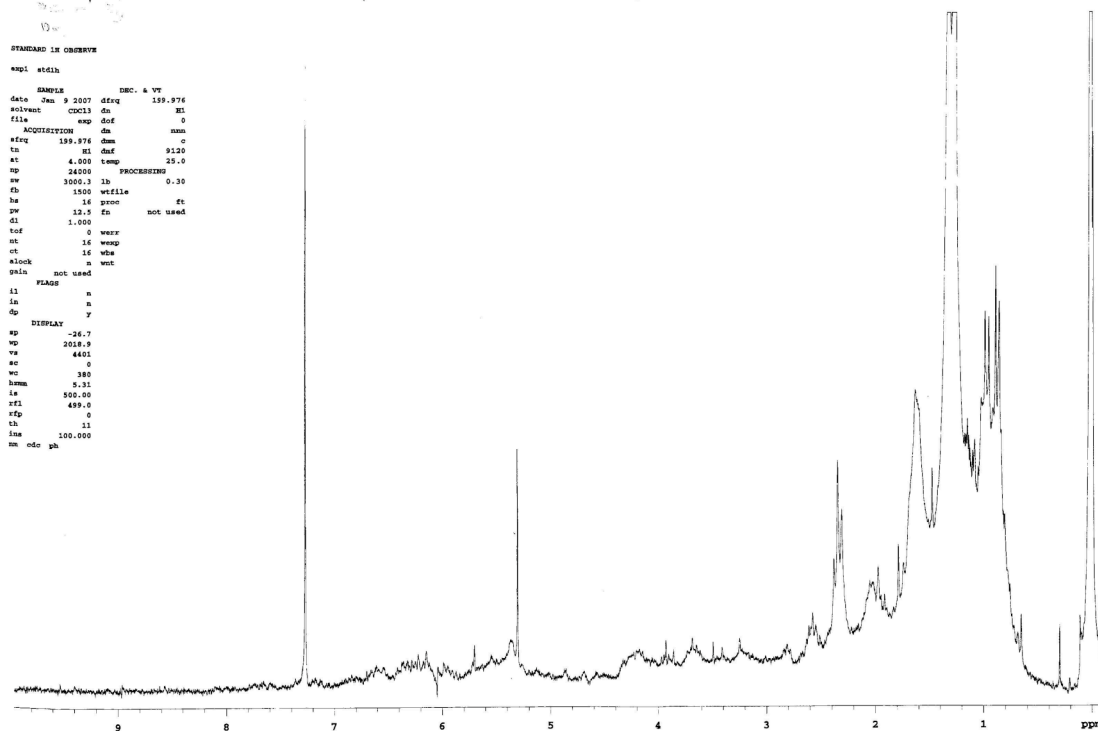
Vedlegg 35: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 21 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



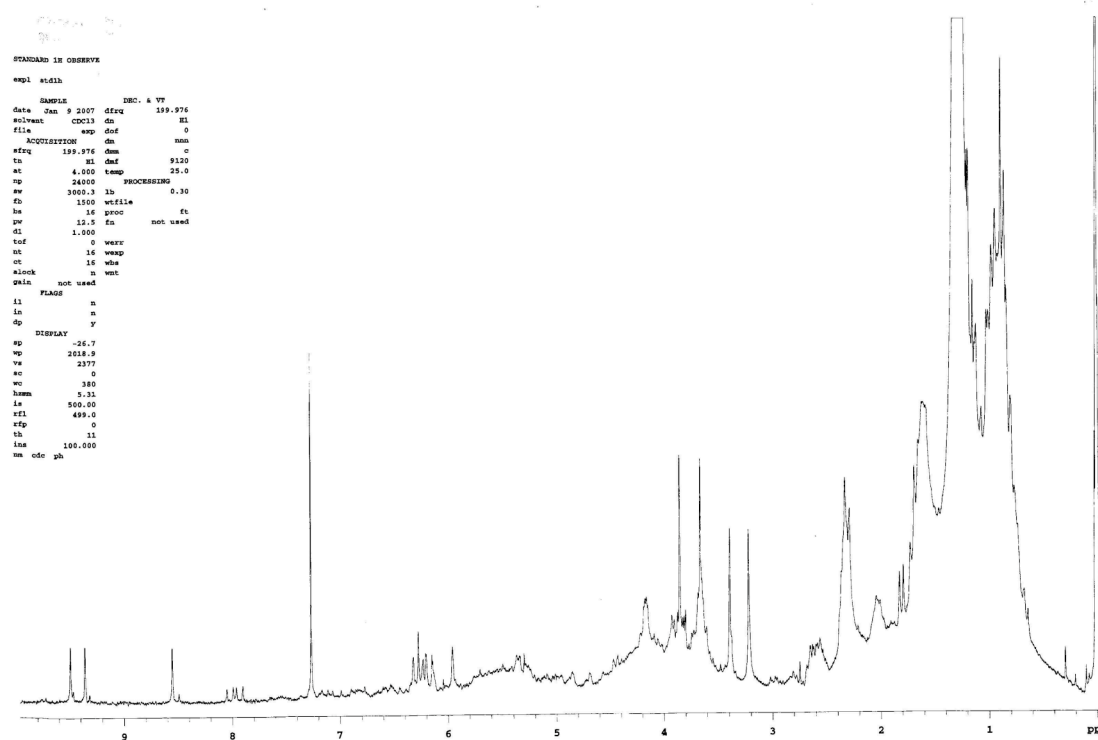
Vedlegg 36: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 22 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



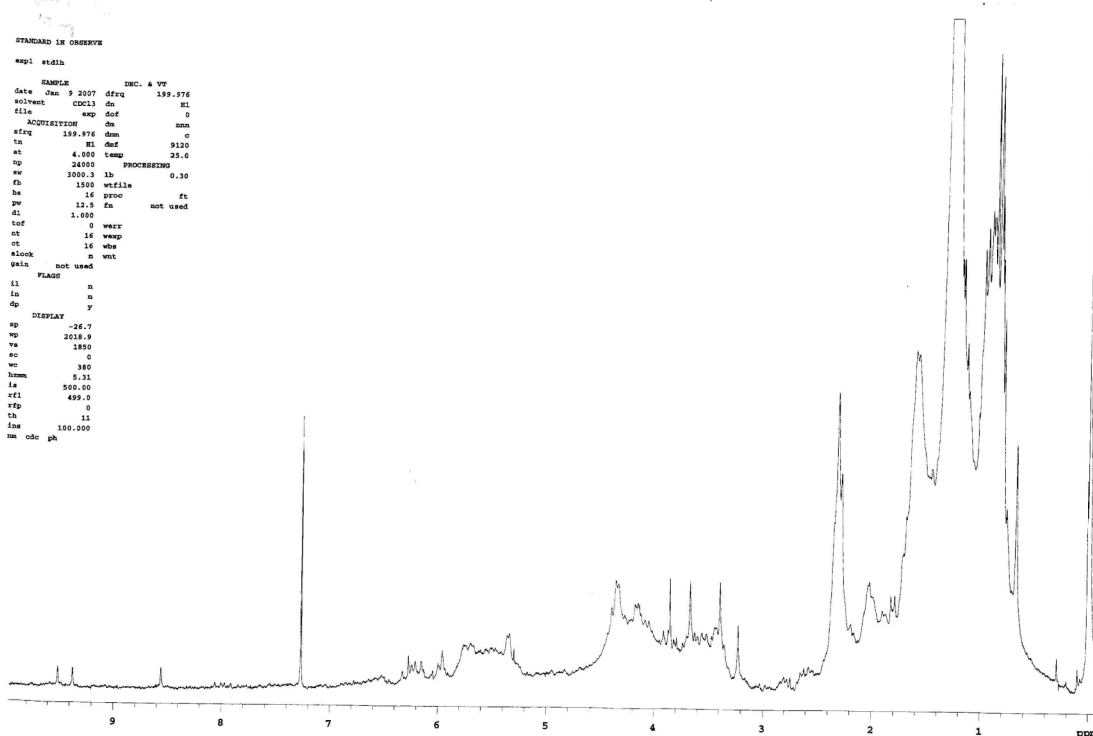
Vedlegg 37: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 23 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



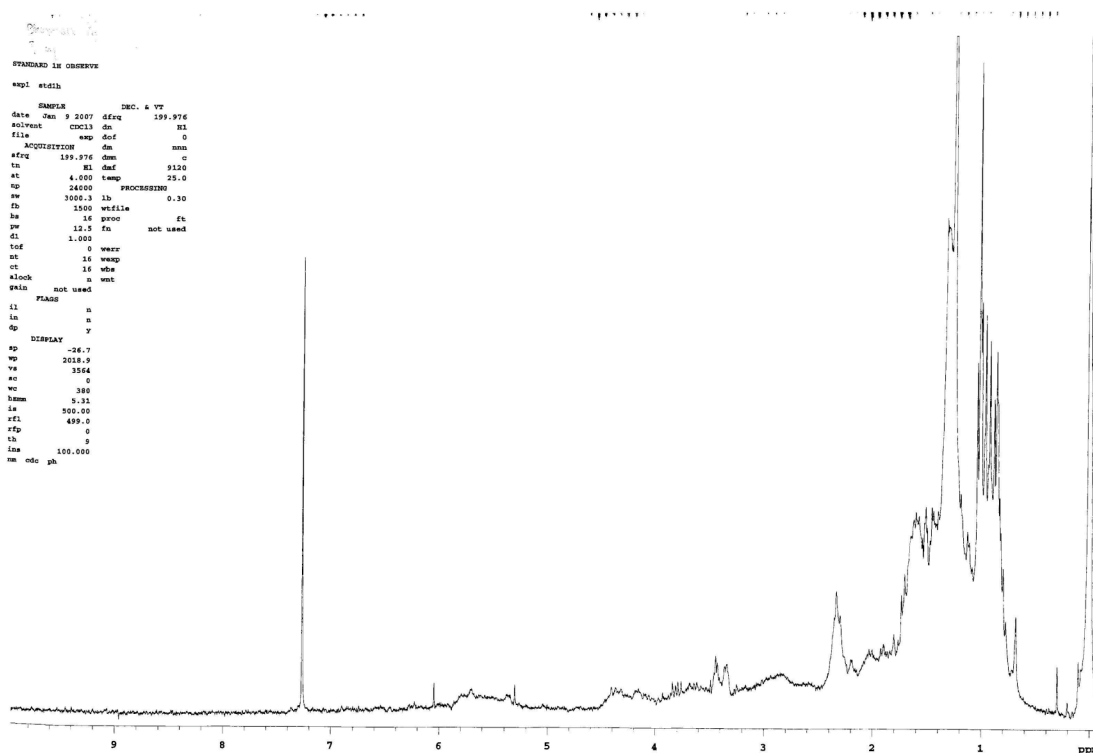
Vedlegg 38: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 24 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



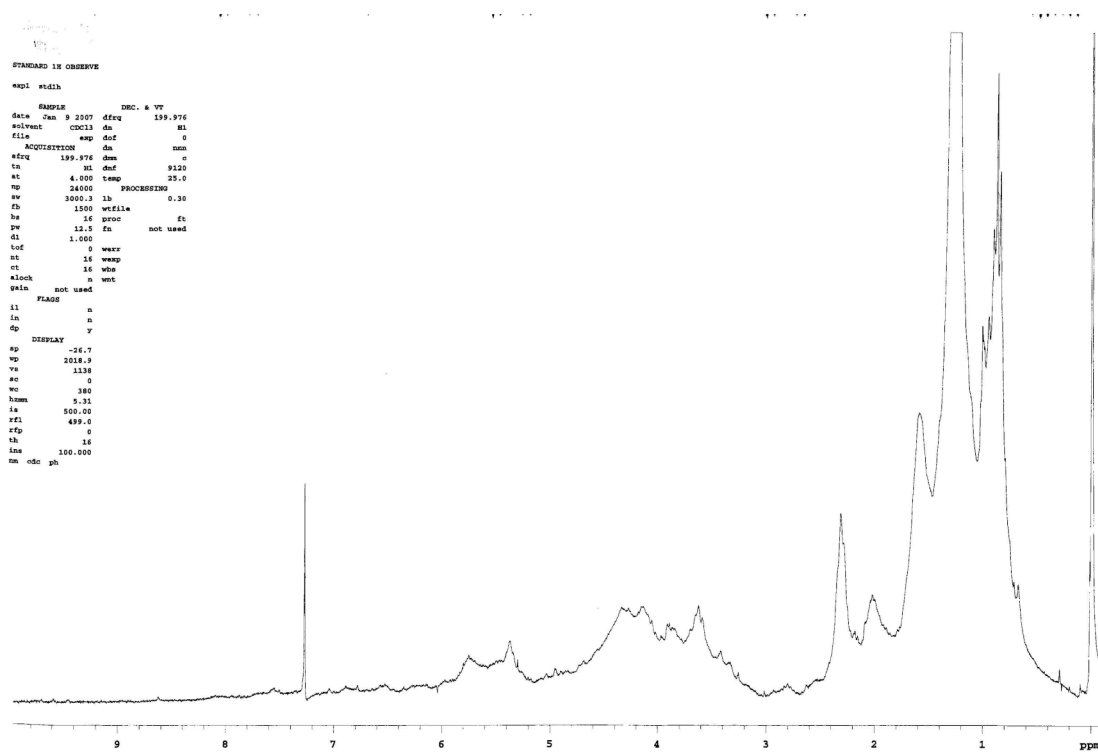
Vedlegg 39: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 25 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



Vedlegg 40: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 26 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



Vedlegg 41: ^1H -NMR-spektrum av fraksjon 27 fra DCM-ekstrakt av økologisk salvie.



Vedlegg 42: Fraksjonering av DCM-ekstrakt av Økologisk salvie.

Fraksjon	Volum (ml)	Elueringsmiddel	DPPH	Fraksjon	Volum (ml)	Masse (mg)
1	20	DCM		1	40	0
2	20	DCM				
3	20	DCM				
4	20	DCM	ja	2	40	102
5	20	DCM				
6	20	DCM				
7	20	DCM	ja	3	40	151
8	20	DCM				
9	20	DCM				
10	20	DCM	ja	4	40	50
11	20	DCM				
12	20	DCM				
13	20	DCM	ja	5	40	12
14	20	DCM				
15	20	DCM				
16	20	DCM	ja	6	100	20
17	20	DCM				
18	20	DCM				
19	20	DCM	ja	7	140	33
20	20	DCM				
21	20	DCM				
22	20	DCM	ja	8	180	26
23	20	DCM				
24	20	DCM				
25	20	1% EtOAc	ja	9	120	28
26	20	1% EtOAc				
27	20	1% EtOAc				
28	20	5% EtOAc	ja	10	120	62
29	20	5% EtOAc				
30	20	5% EtOAc				
31	20	5% EtOAc	ja	11	40	451
32	20	10% EtOAc				
33	20	10% EtOAc				
34	20	10% EtOAc	ja	12	40	532
35	20	10% EtOAc				
36	20	10% EtOAc				
37	20	10% EtOAc	ja	13	40	252
38	20	10% EtOAc				
39	20	10% EtOAc				
40	20	10% EtOAc	ja	14	40	107
41	20	10% EtOAc				
42	20	10% EtOAc				
43	20	10% EtOAc	ja			
44	20	10% EtOAc				
45	20	10% EtOAc				
46	20	10% EtOAc	ja			
47	20	10% EtOAc				
48	20	10% EtOAc				
49	20	10% EtOAc	ja			
50	20	10% EtOAc				

51	20	10% EtOAc				
52	20	10% EtOAc	ja	15	160	226
53	20	10% EtOAc				
54	20	10% EtOAc				
55	20	10% EtOAc				
56	20	10% EtOAc				
57	20	10% EtOAc				
58	20	10% EtOAc				
59	20	10% EtOAc	ja	16	60	43
60	20	10% EtOAc				
61	20	10% EtOAc				
62	20	10% EtOAc	ja	17	120	83
63	20	10% EtOAc				
64	20	10% EtOAc				
65	20	10% EtOAc				
66	20	10% EtOAc				
67	20	25% EtOAc				
68	20	25% EtOAc		18	100	56
69	20	25% EtOAc				
70	20	25% EtOAc				
71	20	25% EtOAc				
72	20	25% EtOAc				
73	20	25% EtOAc				
74	20	25% EtOAc		19	80	100
75	20	25% EtOAc				
76	20	25% EtOAc				
77	20	25% EtOAc				
78	20	25% EtOAc				
79	20	25% EtOAc		20	180	60
80	20	50% EtOAc				
81	20	50% EtOAc				
82	20	50% EtOAc				
83	20	50% EtOAc				
84	20	50% EtOAc				
85	20	50% EtOAc				
86	20	50% EtOAc		21	100	62
87	20	50% EtOAc				
88	20	50% EtOAc				
89	20	50% EtOAc				
90	20	50% EtOAc				
91	20	50% EtOAc		22	100	33
92	20	50% EtOAc				
93	20	50% EtOAc				
94	20	50% EtOAc				
95	20	50% EtOAc				
96	20	50% EtOAc		23	60	10
97	20	50% EtOAc				
98	20	50% EtOAc				
99	20	50% EtOAc		24	240	39
100	20	50% EtOAc				
101	20	50% EtOAc				
102	20	50% EtOAc				

103	20	50% EtOAc				
104	20	50% EtOAc				
105	20	100% EtOAc				
106	20	100% EtOAc				
107	20	100% EtOAc				
108	20	100% EtOAc				
109	20	100% EtOAc				
110	20	100% EtOAc				
111	20	100% EtOAc				
112	20	100% EtOAc				
113	20	100% EtOAc				
114	20	100% EtOAc		25	100	42
115	20	100% EtOAc				
116	20	100% EtOAc				
117	20	100% EtOAc				
118	20	100% EtOAc		26	80	16
119	20	100% EtOAc				
120	20	100% EtOAc				
121	20	100% EtOAc				
122	20	100% EtOAc				
123	20	100% EtOAc				
124	20	Aceton				
125	20	Aceton				
126	20	Aceton				
127	20	Aceton		27	470	189
128	20	Aceton				
129	20	Aceton				
130	20	Aceton				
131	20	DCM				
132	250	DCM				
SUM						2785

Vedlegg 43: Radikalscavengeraktivitet (i prosent) for DCM-fraksjonene til økologisk salvie.

Fraksjon	Konsentrasjon (µg/ml)	% Radikalscavenging	SD	IC ₅₀ (µg/ml)
1	Ikke målt			
2	Ikke målt			
3	83,3	0,2	0,3	-
4	83,3	13,1	0,5	-
5	83,3	35,4	2,8	-
6	83,3	94,4	0,3	29,6±0,8
	41,7	64,3	1,5	
	20,8	35,2	0,7	
7	83,3	93,3	0,3	35,5±1,1
	41,7	57,3	1,5	
	20,8	23,9	1,5	
8	83,3	7,1	0,1	-
9	83,3	76,8	2,3	-
10	83,3	3,5	0,2	-
11	83,3	93,5	0,1	27,5±1,1
	41,7	71,0	1,0	
	20,8	35,8	2,6	
12	83,3	93,0	0,2	19,0±1,0
	41,7	87,7	0,7	
	20,8	52,9	2,6	
	10,4	26,8	2,9	
13	83,3	91,9	0,2	17,2±0,4
	41,7	89,9	2,6	
	20,8	62,5	2,1	
	10,4	27,9	2,1	
14	83,3	92,1	0,3	31,0±2,0
	41,7	64,5	2,2	
	20,8	29,3	1,6	
15	83,3	93,5	0,1	49,9±0,5
	41,7	34,9	1,0	
16	83,3	97,4	0,2	22,4±0,9
	41,7	82,3	2,2	
	20,8	46,2	2,2	
17	83,3	84,8	1,5	44,0±1,0
	41,7	47,5	1,4	
	20,8	19,6	1,8	
18	Ikke målt			
19	Ikke målt			
20	Ikke målt			
21	Ikke målt			
22	Ikke målt			
23	Ikke målt			
24	Ikke målt			
25	Ikke målt			
26	Ikke målt			
27	Ikke målt			

DEL 2: Salvie, *Salvia officinalis* L., som medisinsplante.

Botanisk navn: *Salvia officinalis* L.

Familie: Lamiaceae (Leppeblomst)

Norsk navn: Salvie, kryddersalvie.

Engelsk navn: Sage, Common Sage, Garden Sage, Dalmatian Sage.



Fig.1: *Salvia officinalis* L. (Anonym u.å)

Innledning

Salvie (*S. officinalis* L.) kommer opprinnelig fra Middelhavsområdet, og er en flerårig halvbusk som kan bli 50-60 cm høy. Den har opprette og firkantete stengler med motsatte langstilkete blader. De blåfiolette blomstene danner samlinger av kranser øverst på stengelen. Når salvie blir moden, dekkes den av kjertelhår som gir planten en sølvfarge. Salvie har siden gamle tider blitt brukt i folkemedisinen og var høyt verdsatt som medisinsplante. Den ble spredt rundt i Europa av romerne, og deretter av munkene (Hjelmstad 2006). I middelalderen (i klostertiden) ble salvie brakt til Norge av munkene (Østerud u.å).

Slekten *Salvia* omfatter over 900 ulike arter og er vanlig i hele verden. Men de finnes i store mengder lokalisert i tre områder: I Europa omkring Middelhavsområdet, i Sør-Øst Asia og i Sentral- og Sør-Amerika (Ulubelen 2000).

Slektsnavnet *Salvia* som er utledet fra det latinske ordet *salvare* betyr ”å helbrede”, peker til salviens evne til å bevare helse og helbrede sykdommer. Det finnes flere klassiske utsagn som forteller om salviens helsebringende kraft: ”Hvorfor skal mennesket dø når det vokser salvie i hagen?” og ”Den som vil

leve evig, skal spise salvie i mai”. Riktignok ble også salvie anvendt i folkemedisinen mot nesten all slags sykdommer og plager, samt andre bruksområder: mot overdreven svetting og feber, mot oppblåsthet (tarmgassdempende) og magesmerter (spasmolytisk), mot betennelser i munn, tunge og svelg, mot gikt, mot nervøsitet og som styrkemiddel for hjernen, for å stoppe melkeutskillelse hos ammende, som insektsdrepende middel, til sårheling, som bakteriedrepende middel og astringerende middel, dessuten til hud- og hårpleie (Dweck 2000).

Krydder og planter har lenge vært brukt som konserveringsmiddel i mat blant annet for å hindre vekst av mikroorganismer og peroksidering av fett, på grunn av antimikrobiell og antioksidant aktivitet. Tryggheten ved bruk av syntetiske antioksidanter, som BHT (butylert hydroksytoluen) i matkonservering er usikkert (Haumann 1990). Dessuten er antioksidanter i kostholdet postulert å spille en viktig rolle i å hindre sykdommer forårsaket av oksidativt stress (Aruoma 1994; Halliwell 1996; Meltzer og Malterud 1997; Stahl og Sies 1997; Lindsay og Astley 2002). Derfor er det økende interesse for søken etter antioksidanter fra krydder og planter både fra den industrielle og den vitenskapelige siden (Calucci et al. 2003). En rekke studier gjort på salvie viser at det har et høyt innhold av fenoliske komponenter som er potente antioksidanter (Dorman et al. 2003; Ninfali et al. 2005; Shan et al. 2005). Basert på den tradisjonelle bruken til salvie, studeres det for tiden mye på salviens medisinske egenskaper (Kavvadias et al. 2003; Kennedy og Scholey 2005; Longaray Delamare et al. 2007).

Det er kjent at innholdsstoffer som fenoliske komponenter og eteriske oljer i salvie varierer mye blant annet etter vekstforhold (Giannouli og Kintzios 2000; Munne-Bosch et al. 2001; Munne-Bosch og Alegre 2003) og tid for innhøsting (Dragland et al. 2003). Fra en rekke forsøk er det vist mulighet for å produsere potente antioksidanter fra salvie som kan standardiseres ved hjelp av *in vitro* kulturer, uavhengig av miljøfaktorer (Santos-Gomes et al. 2002; Grzegorzcyk et al. 2007).

En statistikk over publiserte artikler om salvie utgitt per år, hentet fra Scifinder, viser en tilnærmet eksponensiell økning på studier gjort på salvie i de siste 15-20 årene. Dette tyder på økende interesse for salvie (fig. 2).

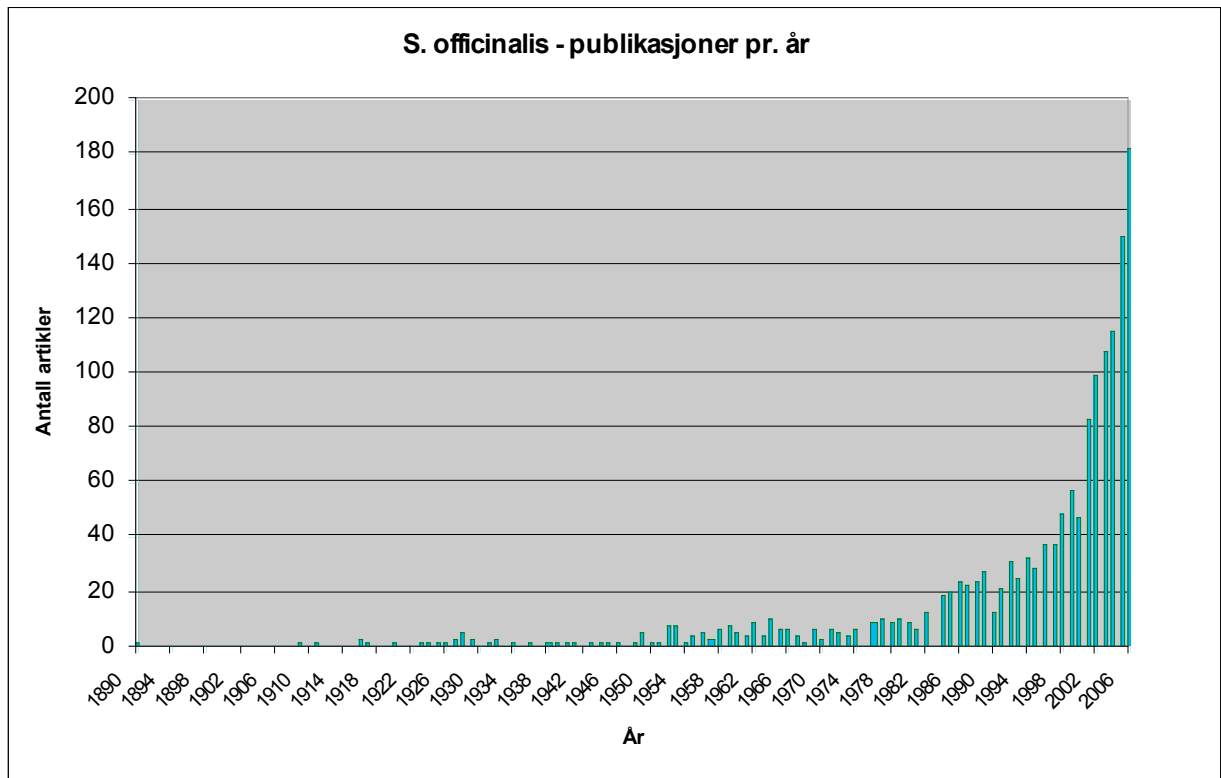


Fig. 2: Statistikk over antall publikasjoner om salvie per år. Kilde: Scifinder.

Metode

Litteraturen til *S. officinalis* ble først og fremst søkt i databasen SciFinder. Søket startet med artikler fra 2007 og bakover. Boka "Sage – The Genus *Salvia*" av Kintzios (2000) ble også anvendt.

Vitenskapelige undersøkelser

Kjemiske innholdsstoffer

Den overjordiske delen til planter av slekten *Salvia* inneholder vanligvis flavonoider, triterpenoider, diterpenoider og flyktige komponenter som monoterpenoider. I røttene er det hovedsakelig diterpenoider (Ulubelen 2000).

Triterpenoider:

Oleanolsyre og ursolsyre

Oleanolsyre og dens isomer ursolsyre er triterpenoider som finnes utbredt i planter i form av fri syre eller som aglykondel for triterpenoidsaponiner (Jie 1995). Ursolsyre og oleanolsyre har blitt isolert fra kloroformekstrakt av salvieblader. Forbindelsene ble identifisert ved hjelp av HPLC-UV-MS/MS-metode (Baricevic et al. 2001).

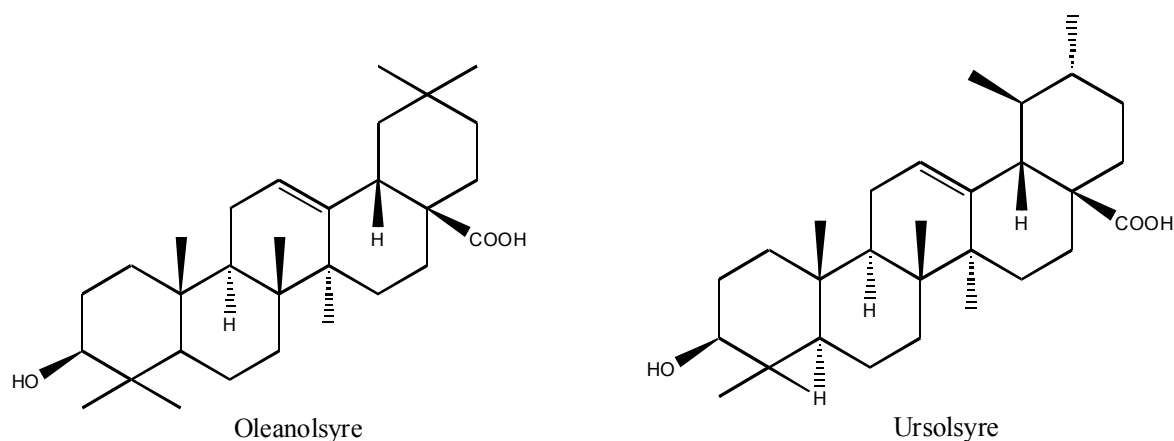
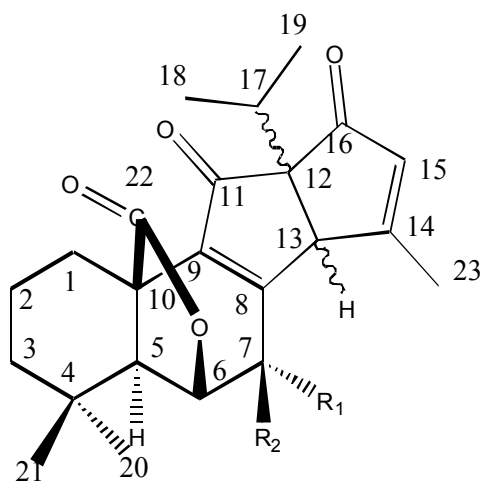


Fig. 3: Oleanolsyre og ursolsyre.

Apianan terpenoider:

Miura et al. isolerte tre nye forbindelser fra diklormetaneekstrakt av salvieblader. Strukturen til disse forbindelsene ble klarlagt ved hjelp av HR-MS (høyoppløsning massespektroskopi), NMR (kjernemagnetisk resonans)- og IR (infrarød)-spektroskopi. Forbindelsene er C_{23} terpenoider, kalt apianan (Miura et al. 2001). Slike apianan terpenoider ble først isolert fra *S. apiana* (Luis et al. 1996).



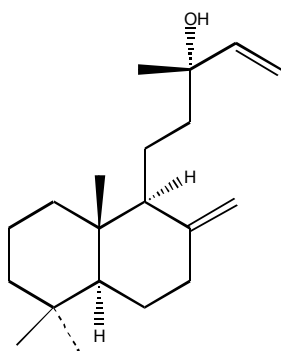
- 1: (12S, 13R) $R_1 = OH$ $R_2 = H$
 2: (12S, 13R) $R_1 = H$ $R_2 = OH$
 3: (12R, 13S) $R_1 = OH$ $R_2 = H$

Fig. 4: Tre nye apianan terpenoider i salvie

Diterpenoider:

Manool

Manool ble for første gang identifisert fra dampdestillert olje av salvie, ved hjelp av NMR-spektroskopi og GC (gasskromatografi)/MS av Perry et al. (1996). Velickovic et al. isolerte manool fra etanolekstrakter av salvie, og strukturen ble identifisert ved hjelp av GC-FID (flammeionisasjonsdeteksjon) og GC-MS (Velickovic et al. 2003a).



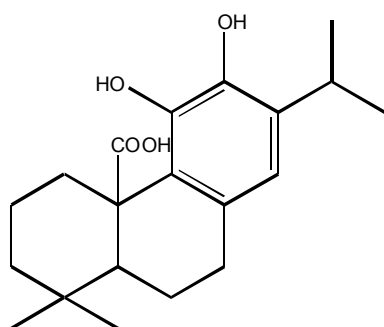
Manool

Fig. 5: Manool.

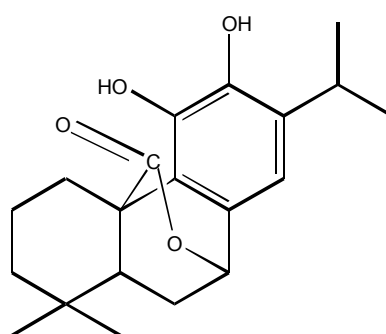
- **Fenoliske diterpenoider**

Carnosinsyre, carnosol, epirosmanol, metylcarnosat, rosmadial og rosmanol

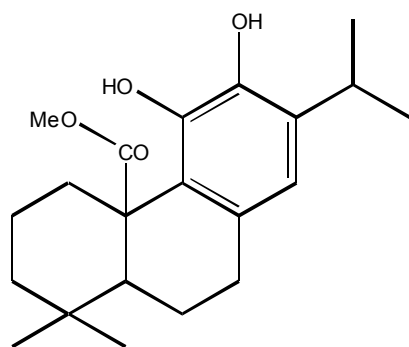
Carnosinsyre, carnosol, epirosmanol, metylcarnosat, rosmadial og rosmanol ble isolert og separert fra salvieoleoresin (en blanding av et resin og en eterisk olje) ved hjelp av kolonne kromatografi og HPLC (høytrykks væskkromatografi). Disse stoffene ble identifisert ved hjelp av IR- spektrometri, MS og ^1H -NMR-spektroskopi. (Cuvelier et al. 1994). I kloroplaster i salvieblader ble det funnet carnosol, og det har vært foreslått at dens oppgave er å beskytte kloroplastene mot oksidativ skade, for eksempel ved tørke (Munne-Bosch et al. 2001).



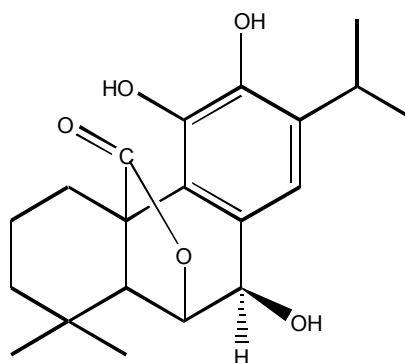
Carnosinsyre



Carnosol



Metylcarnosat



Epirosmanol

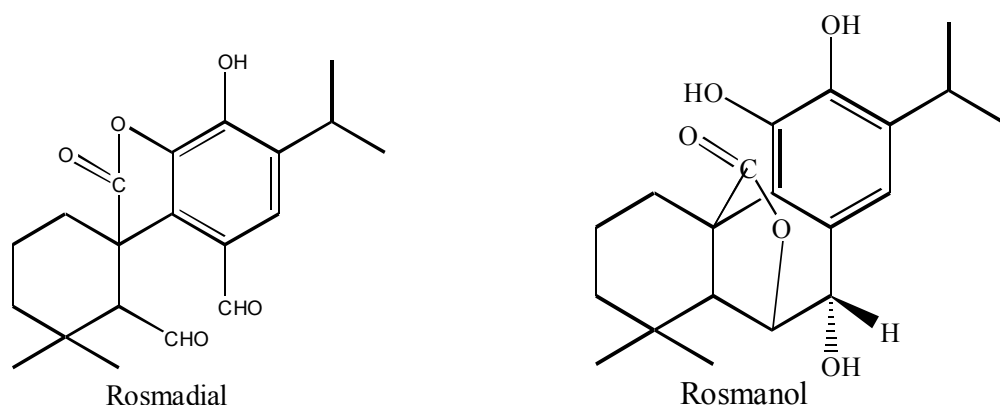
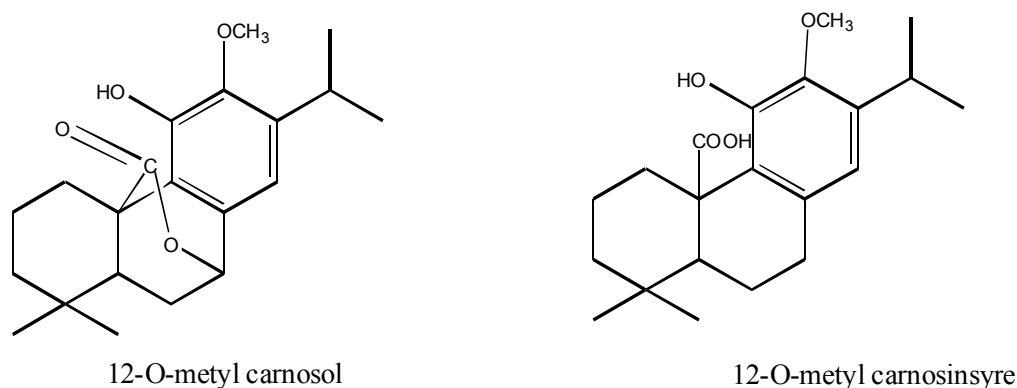
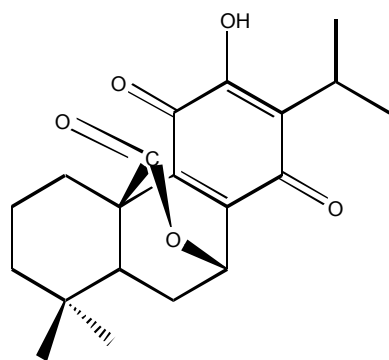


Fig. 6: Fenoliske diterpener i salvie.

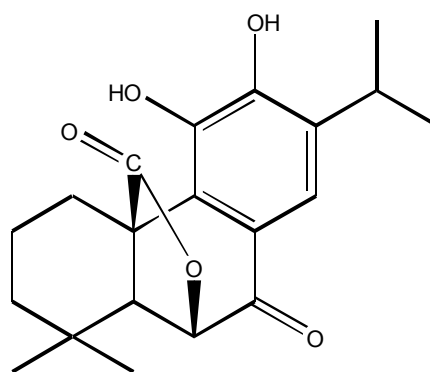
12-*O*-metyl carnosol, 12-*O*-metyl carnosinsyre, columbaridion, galdosol, miltiron, atuntzensin A, rosmadial, isorosmanol, epirosmanol, rosmanol, carnosinsyre og carnosol.

Miura et al. isolerte 12-*O*-metyl carnosol som et nytt diterpenoid fra salvieblader ekstrahert med DCM (diklormetan), samt andre kjente diterpenoider: 12-*O*-metyl carnosinsyre, columbaridion, galdosol, miltiron, atuntzensin A, rosmadial, isorosmanol, epirosmanol, rosmanol, carnosinsyre og carnosol. Forbindelsene ble identifisert ut fra NMR-spektra (Miura et al. 2002). Kavvadias isolerte 7-metoksyrosmanol og galdosol fra dietyleter og n-heksanfraksjon av metanolekstrakt av salvieblader (Kavvadias et al. 2003).

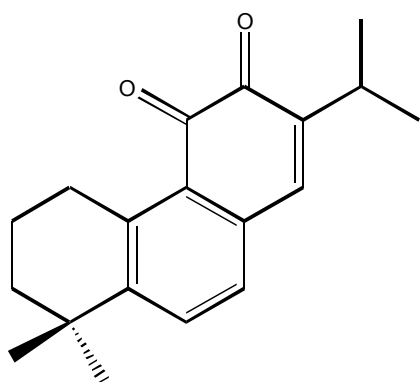




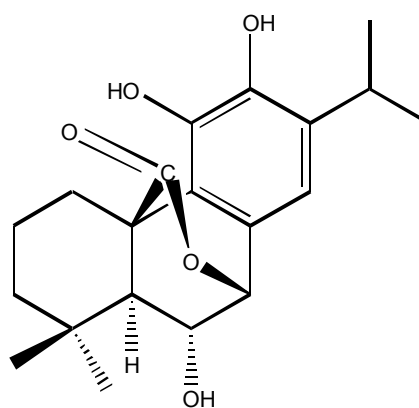
Columbaridion



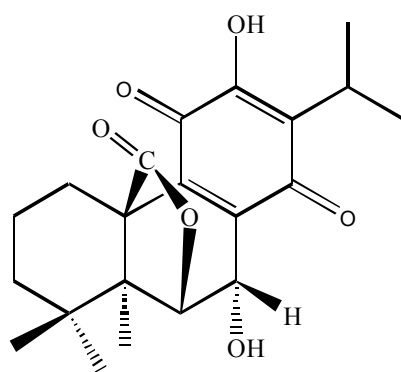
Galdosol



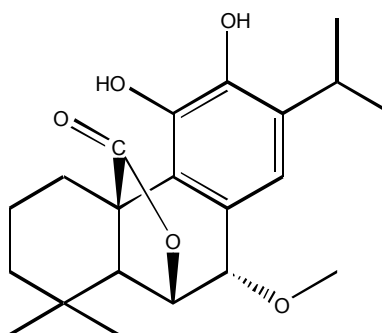
Miltiron



Isorosmanol



Atuntzesin A



7-metoksyrosmanol

Fig. 7: Fenoliske diterpenoider i salvie

Fenoliske komponenter:

- **Fenoliske syrer**

Rosmarinsyre og kaffesyre

Rosmarinsyre og kaffesyre har blitt isolert fra kommersielle salvieekstrakter og identifisert ved hjelp av HPLC/MS/APCI (atmosfærisktrykk kjemisk ionisasjon) og ved hjelp av HPLC koblet til fotodiode array spektrofotometer (Cuvelier et al. 1996). Wang et al. har isolert kaffesyre fra butanolfraksjon av salviebladekstrakt. Strukturen ble klarlagt ved hjelp av MS, NMR- og 2D-NMR-spektroskopi (Wang et al. 2000). Fra vannekstrakt av salvie ble rosmarinsyre funnet å være hovedkomponenten. Dette ble bekreftet ved hjelp av HPLC (Dorman et al. 2003). Shan et al. har også isolert og identifisert kaffesyre og rosmarinsyre fra ekstrakt av salviekrydder (Shan et al. 2005). Rosmarinsyre har dessuten blitt isolert fra ekstrakter av salvierøtter (Grzegorzcyk et al. 2007).

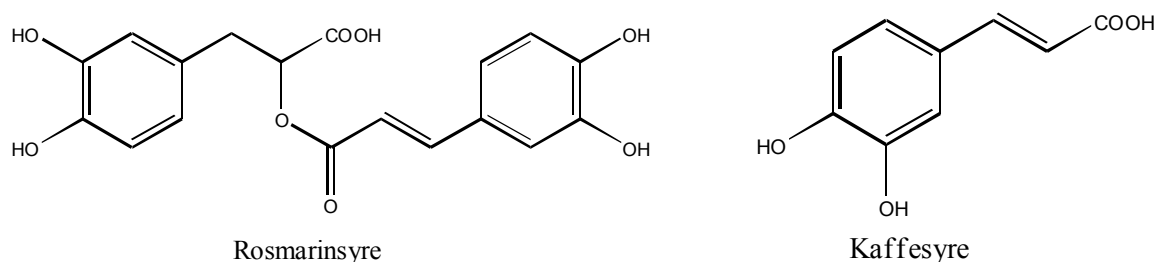
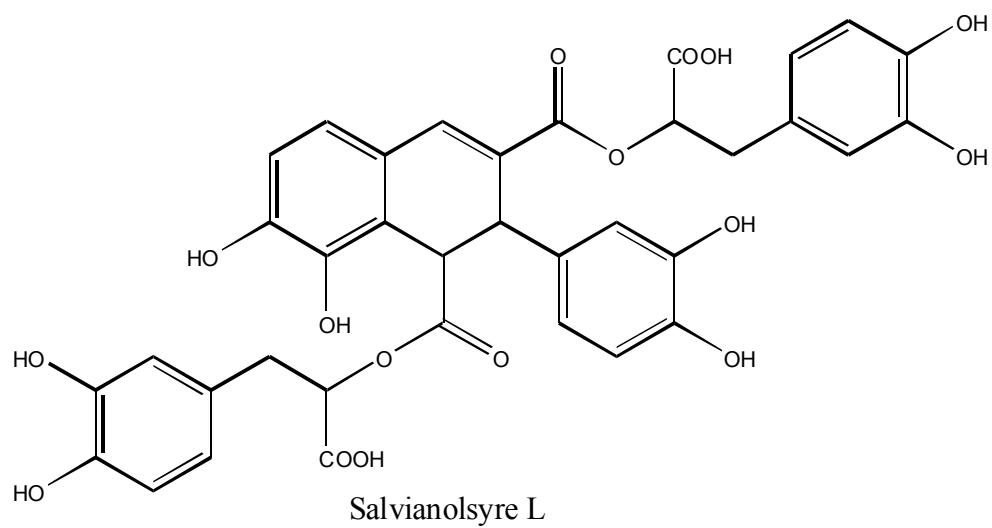
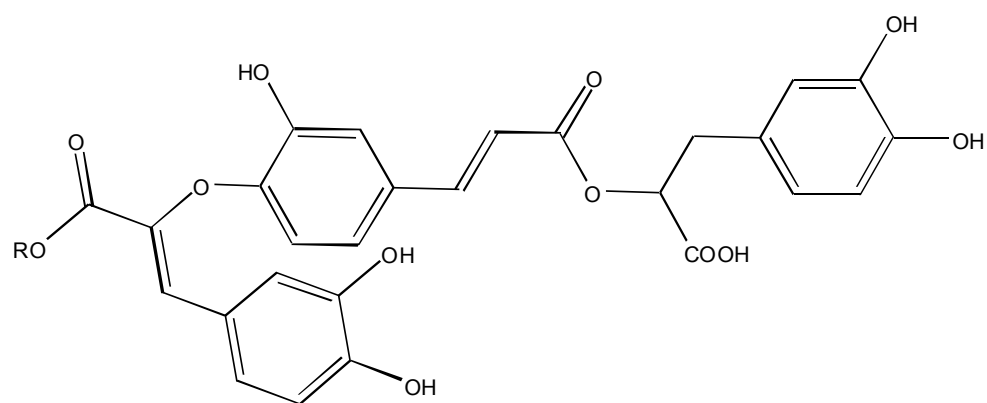
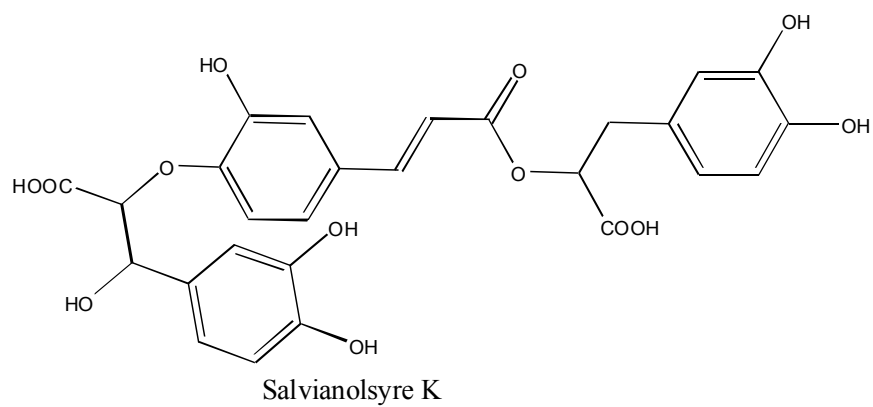


Fig. 8: Rosmarinsyre og kaffesyre

Sagerinsyre, salvianolsyre I, K og L

Sagerinsyre og salvianolsyre K ble isolert sammen med rosmarinsyre fra salvieekstrakt etter fjerning av flyktige komponenter (Lu og Foo 1999a). Videre gransking av salvieekstrakt førte til isolering av nye rosmarinsyre derivater: sagekumarin, salvianolsyre I, metylmelitrat A (Lu et al. 1999b) og salvianolsyre L (Lu og Foo 2001b). Strukturene ble klarlagt ved hjelp av NMR-spektroskopi (Lu et al. 1999b; Lu og Foo 2001a; Lu og Foo 2001b)



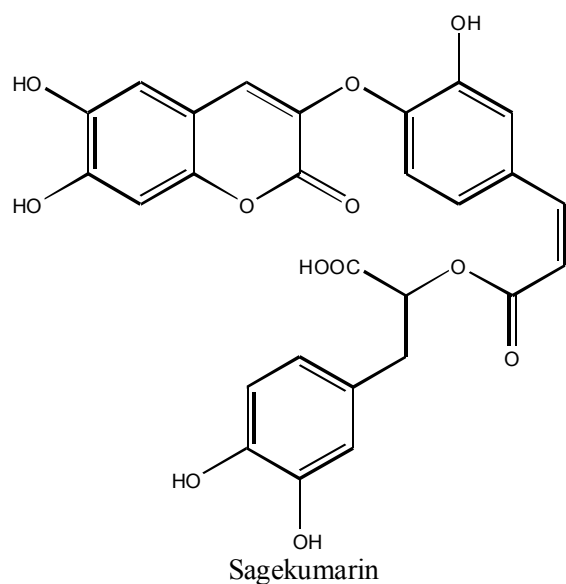
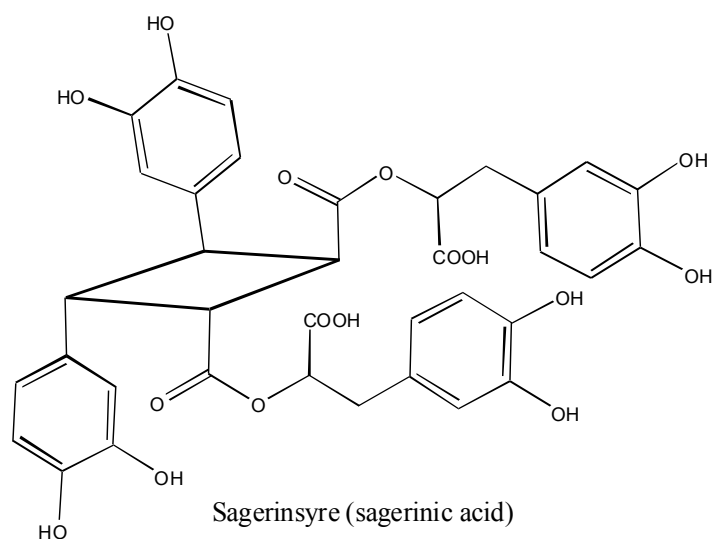


Fig. 9: Rosmarinsyre oligomere i salvie

p-hydroksybenzozyre og (-)-hydroksyjasmonsyre (en ikke-fenolisk syre)

Wang et al. (2000) isolerte p-hydroksybenzozyre og (-)-hydroksyjasmonsyre fra butanolfraksjon av salviebladekstrakter. Strukturene ble klarlagt ved fortolking av MS-, NMR- og 2D-NMR-spektra.

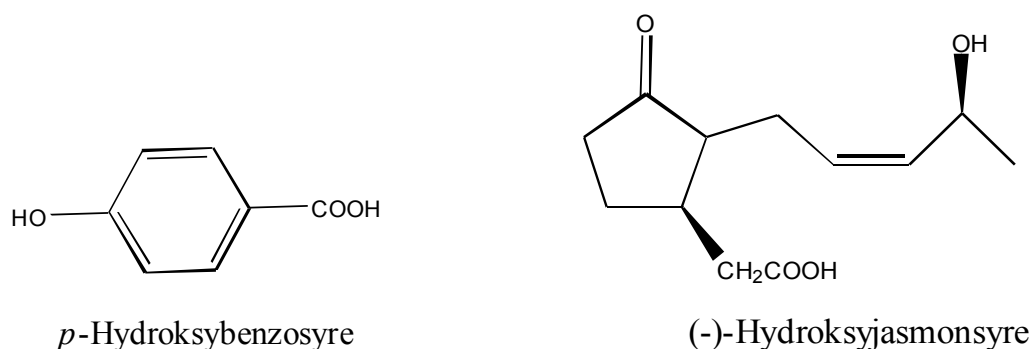
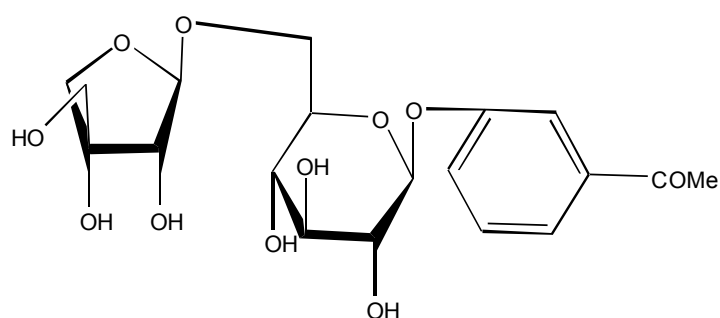


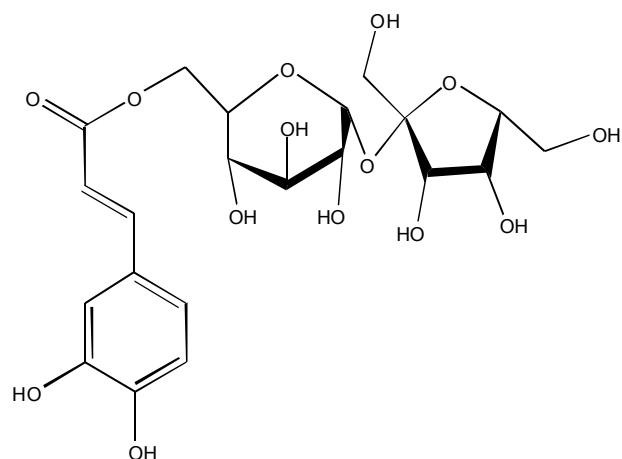
Fig. 10: *p*-hydroksybenzoesyre og (-)-hydroksyjasmonsyre.

- **Fenoliske glykosider**

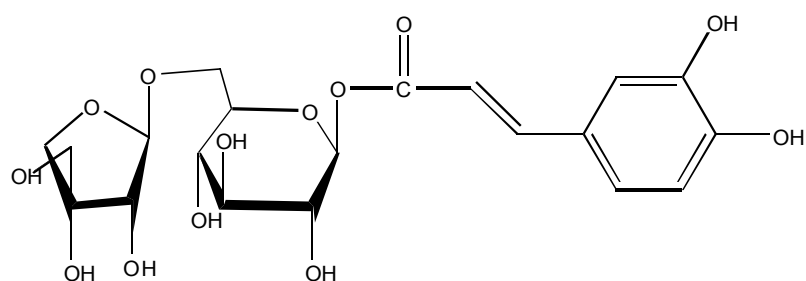
Wang et al. isolerte glykosidet (1) fra butanolfraksjon av salviebladekstrakt, og rapporterte den som en ny forbindelse i salvie (Wang et al. 1998). Videre arbeid med butanolfraksjon av salviebladekstrakt førte til isolering og identifisering av nye fenoliske glykosider: (2), (3) og (4) (Wang et al. 1999) og (5) og (7), samt et ikke-fenolisk glykosid (6) (Wang et al. 2000). Forbindelse (1) ble identifisert ved fortolkning av NMR-, MS- og IR-spektra. Strukturen til forbindelsene (2), (3) og (4) ble bestemt ved hjelp av FABMS ("fast atom bombardment" massespektroskopi) -, 1D- og 2D-NMR-spektra. Forbindelsene (5), (7) og det ikke-fenoliske glykosidet (6) ble bestemt ved hjelp av MS, NMR og 2D-NMR-spektroskopi. Forbindelse (1) ble også isolert av Lu og Foo (2000) fra en 70 % vandig acetonekstrakt av salvie, sammen med to nye fenoliske glykosider (8) og (9). Disse forbindelsene ble identifisert ved fortolkning av NMR og 2D-NMR-spektra. Forbindelse (8) og (9) har ikke blitt beskrevet tidligere.



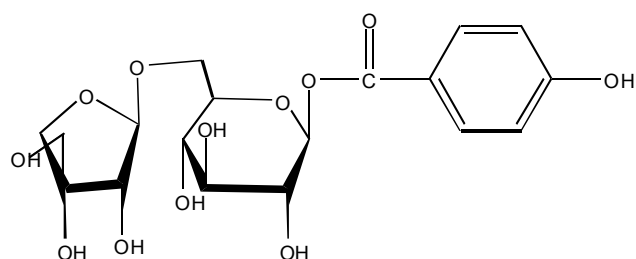
4-hydroksyacetofenon-4-O-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-O-β-D-glukopyranosid (1)



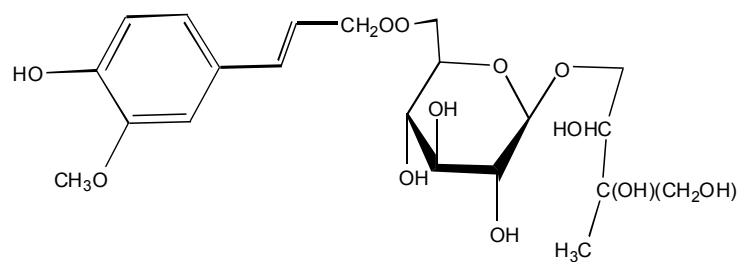
6-kaffeoyl- β -D-fruktofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glukopyranosid (**2**)



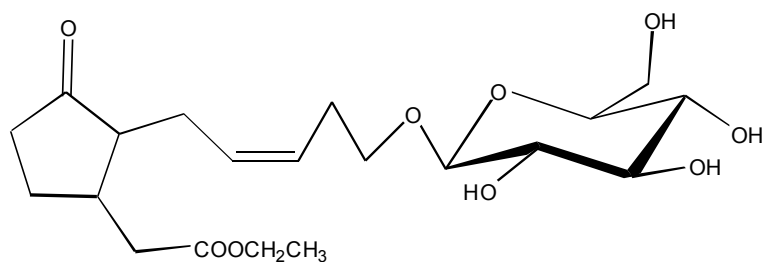
1-O-kaffeoyl- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopyranosid (**3**)



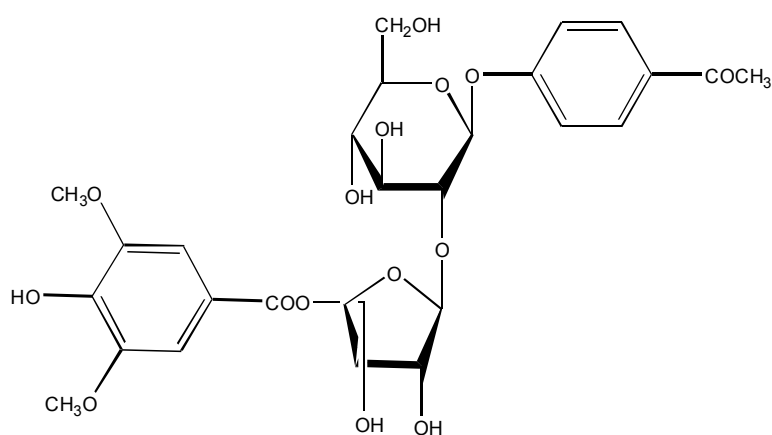
1-O-p-hydroksybenzoyl- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopyranosid (**4**)



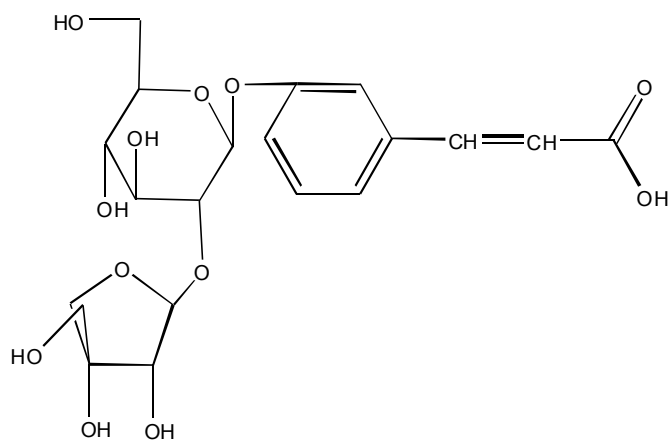
1-O-(2,3,4-trihydroksy-3-metyl)butyl-6-O-feruloyl- β -D-glukopyranosid (**5**)



Etyl β -D-glukopyranosyl tuberonat (**6**)



4-hydroksyacetofenon 4-O-[5-O-(3,5-Dimetoksy-4-hydroksybenzoyl)- β -D-apiofrunosyl]-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopyranosid (**7**)



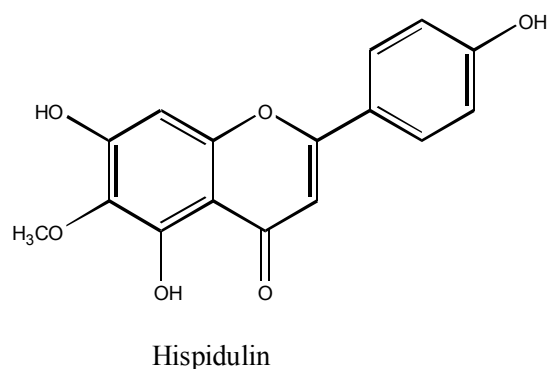
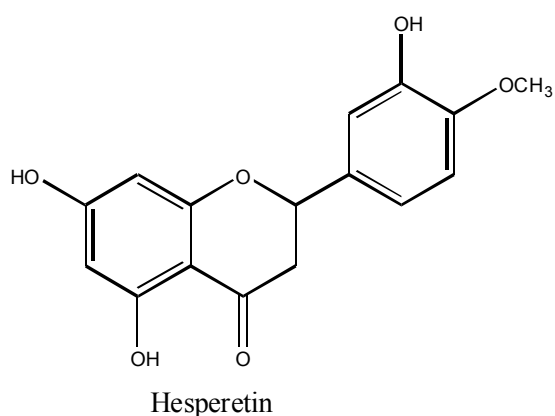
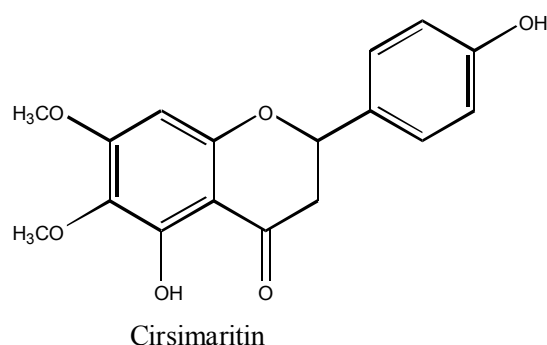
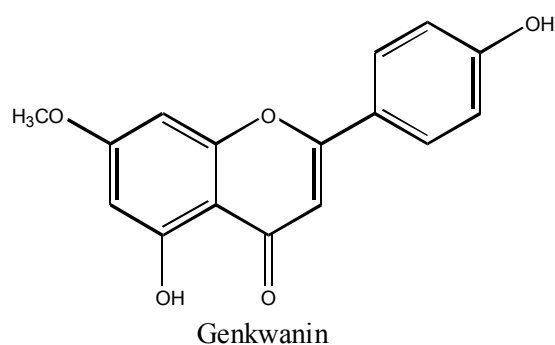
Cis og trans -p-kumarsyre 4-O-(2'-O- β -D-apiofuranosyl)- β -D-glukopyranosid (**8**) og (**9**)

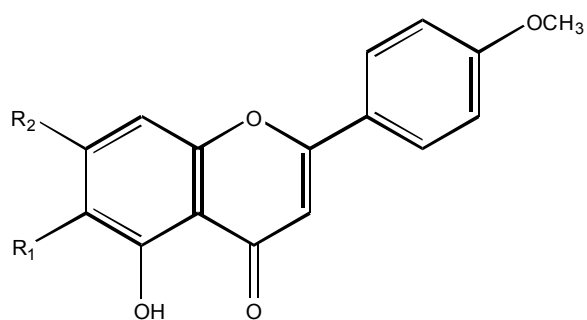
Fig. 11: Fenoliskeglykosider og et ikke-fenolisk glykosid i salvie.

- **Flavonoider**

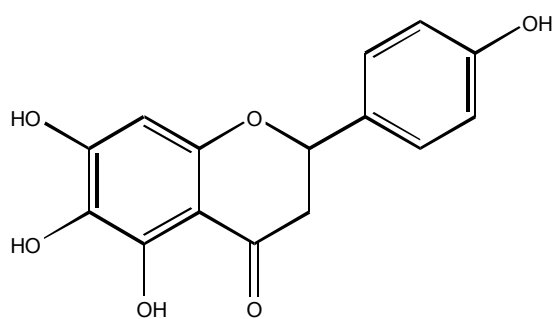
Genkwanin, cirsimaritin, salvigenin, 5-hydroksy-7,4'-dimetoksy flavon, hispidulin, luteolin, apigenin, eupafolin, scutellarein, ladanein, cirsilinol og cirsilineol.

Genkwanin, cirsimaritin og scutellarein har blitt isolert fra salvieekstrakt (Cuvelier et al. 1996; Santos-Gomes et al. 2002). Salvigenin, 5-hydroksy-7,4'-dimetoksy flavon, hispidulin, cirsimaritin og genkwanin ble isolert og identifisert fra diklormetaneekstrakt av salvieblader etter rensing ved gjentatt kromatografi over silikagel og Sephadex LH-20. Rensing og isolering av diklormetaneekstraktet ga blant annet en fraksjon som er løselig i diklormetan. Videre rensing og isolering av substanser fra denne fraksjonen ga flavonoidene apigenin, hispidulin, luteolin og eupafolin (Miura et al. 2002). Luteolin, apigenin, genkwanin, scutellarein, ladanein, hispidulin, cirsilinol, cirsilineol, cirsimaritin og salvigenin har blitt isolert fra acetoneekstraktet til den overjordiske delen til salvie. Luteolin, hispidulin, cirsilineol og cirsimaritin ble funnet i større mengder enn de andre flavonoidene i salvie (Nikolova et al. 2006).

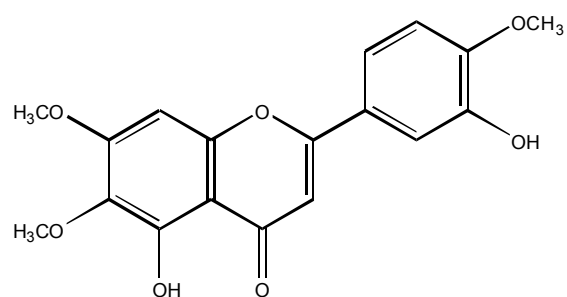




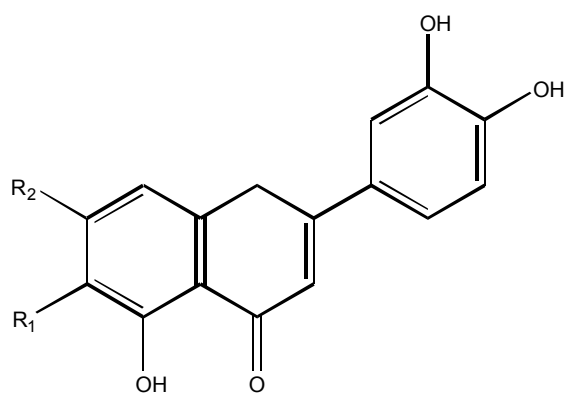
5-hydroksy-7,4'-dimetoksy flavon: $R_1 = H$ $R_2 = OCH_3$
 Salvigenin: $R_1 = OCH_3$ $R_2 = OCH_3$



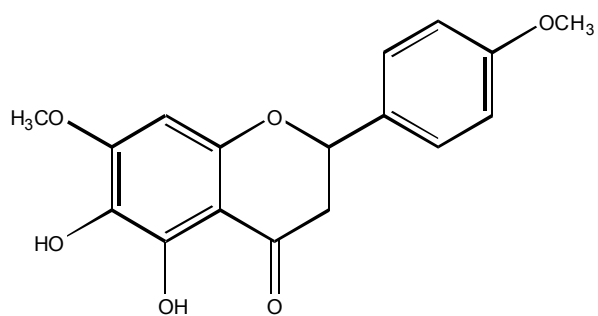
Scutellarein (5,6,7,4'-tetrahydroksyflavon)



Cirsilineol



Luteolin: $R_1 = H$ $R_2 = OH$
 Eupafolin: $R_1 = OCH_3$ $R_2 = OH$



Ladanein (5,6-dihydroksy-7,4'dimetoksyflavon)

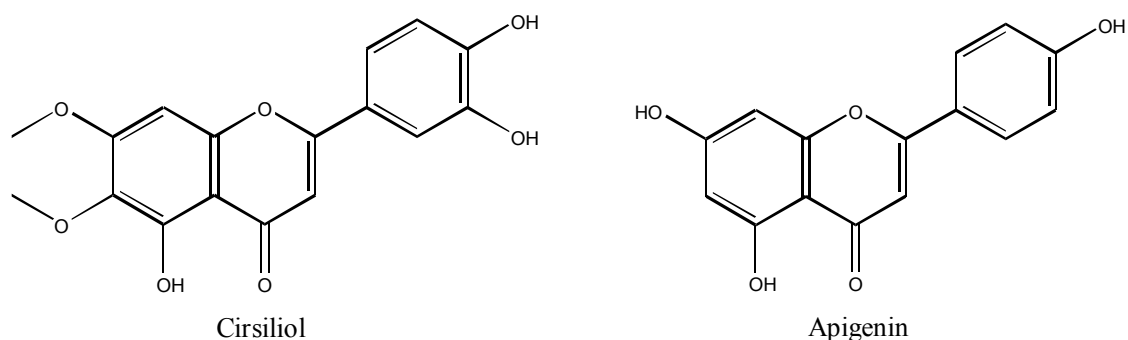
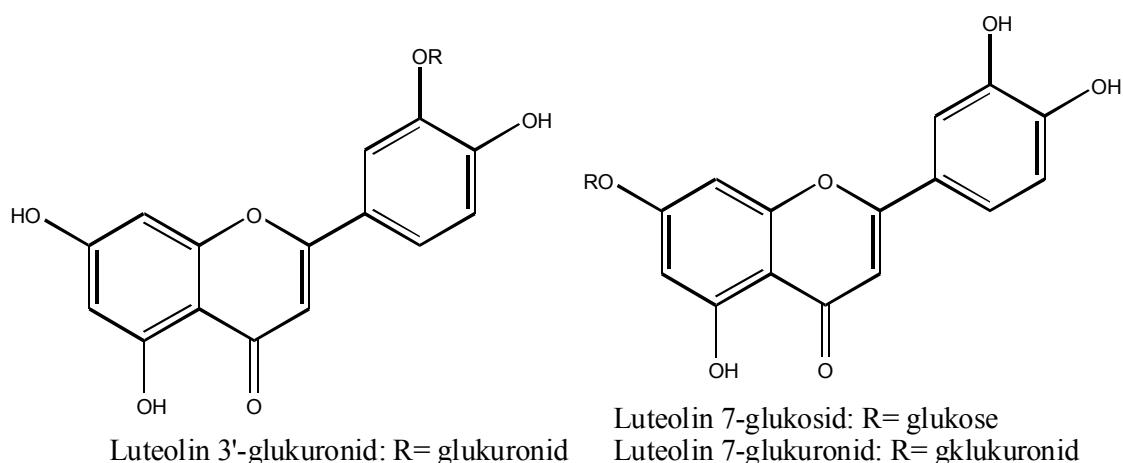


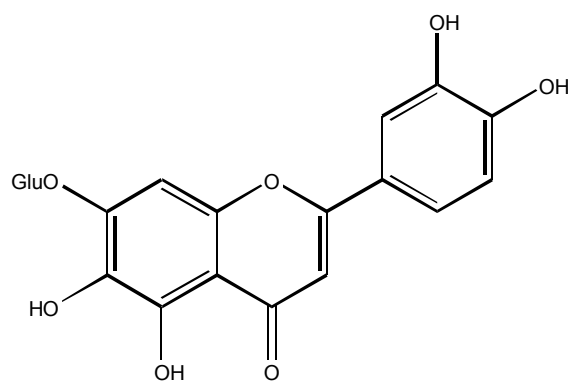
Fig. 12: Flavonoider i salvie.

• Flavonoidglykosider

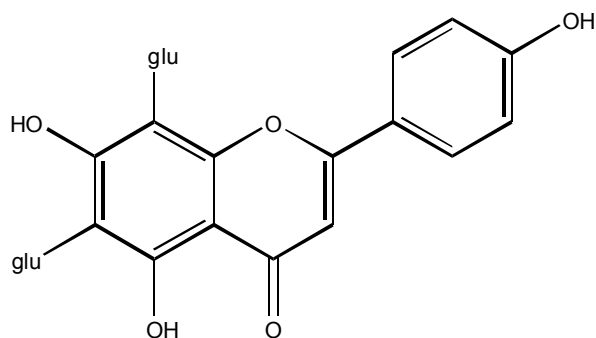
6-hydroksyluteolin 7-glukosid, luteolin 7-glukosid, luteolin 3'glukuronid, luteolin 7-glukuronid, 6-hydroksyluteolin 7-glukuronid og apigenin 6,8-di-C-glukosid.

Cuvelier et al. har isolert 6-hydroksyluteolin 7-glukosid fra kommersielle salvieekstrakter (Cuvelier et al. 1996). Luteolin 7-glukosid ble isolert fra en butanolfraksjon fra salvieekstrakt (Wang et al. 1998). Lu og Foo isolerte 6-hydroksyluteolin 7-glukosid og luteolin 7-glukosid sammen med luteolin 3'glukuronid, luteolin 7-glukuronid, 6-hydroksyluteolin 7-glukuronid og apigenin 6,8-di-C-glukosid, fra vannfraksjoner av salvieekstrakt. Luteolin 7-glukosid og luteolin 7-glukuronid ble funnet i større mengder enn de andre flavonoidene. Apigenin 6,8-di-C-glukosid og 6-hydroksyluteolin 7-glukuronid ble identifisert som nye forbindelser i salvie. Forbindelsene ble identifisert ved hjelp av NMR-spektroskopi (Lu og Foo 2000).

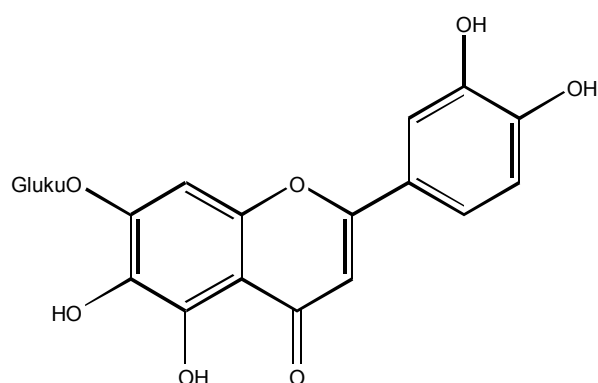




6-hydroxyluteolin 7-glukosid



Apigenin 6,8-di-C-glukosid



6-hydroxyluteolin 7-glukuronid

Fig. 13: Flavonoidglykosider i salvie.

Eterisk olje:

Salvia officinalis er antatt å ha det høyeste innholdet av eteriske oljer i slekten *Salvia*. Hovedkomponentene i den eteriske oljen til salvie er α - og β -thujon (35-50 %, hovedsakelig α). Andre komponenter inkluderer 1,8-cineol, borneol, kamfer, karyofyllen og linalylacetat. Det finnes minst to kjemotyper av *S. officinalis*, en med lavt innhold av β -thujon (4-8 %) og en annen med relativt høyt innhold (16-32 %) (Giannouli og Kintzios 2000).

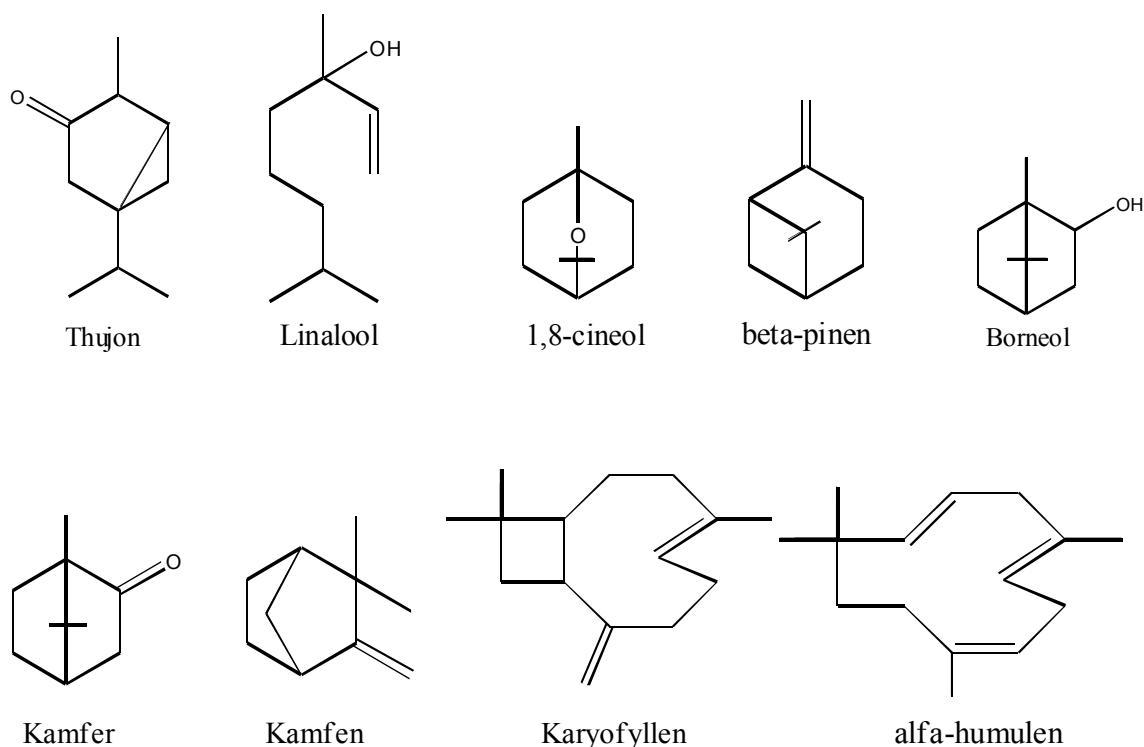
Den eteriske oljen til salvie inneholder i overkant av 60 forskjellige kjemiske komponenter. Det er stor variasjon i den kjemiske sammensetningen til den eteriske oljen, blant annet på grunn av miljøfaktorer. I tabell 1 er det kun tatt med komponenter som utgjør 10 % eller mer av den eteriske oljen. Dataene er hentet fra mange forskjellige referanser, derfor er det variasjon i innholdet (Giannouli og Kintzios 2000). Tallene for konsentrasjon er angitt å være for

prosent av eterisk olje, men de laveste verdiene kan synes å stemme bedre overens med verdier for prosent i planten.

Tabell 1: Kjemiske komponenter i den eteriske oljen til salvie som utgjør 10 % eller mer.

Forbindelse:	Konsentrasjon i % i olje
Karyofyllen	0,10 - 10,00 %
Kamfen	0,80 - 10,29 %
β -Pinen	0,20 - 14,48 %
Borneol	0,60 - 15,50 %
Humulen	0,02 - 16,40 %
α - Humulen	0,18 - 18,95 %
β -Thujon	1,02 - 40,10 %
Kamfer	0,40 - 44,00 %
α -Thujon	1,20 - 45,80 %

I tabell 1 er det ikke tatt med 1,8-cineol, men flere kilder har rapportert at 1,8-cineol er en av hovedkomponentene, og utgjør mer enn 10 % av den eteriske oljen til salvie (Perry et al. 1999; Santos-Gomes og Fernandes-Ferreira 2001; Velickovic et al. 2003b; Vukovic-Gacic et al. 2006).



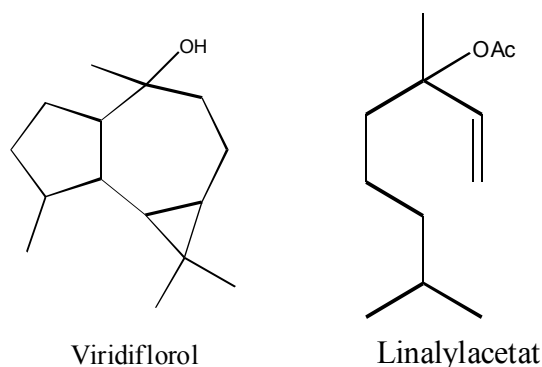


Fig. 14: Hovedkomponentene i den eteriske oljen til salvie.

Polysakkarider:

Den overjordiske delen til salvie ble ekstrahert med metanol-kloroform og deretter ekstrahert i følgende rekkefølge: vann, vandig ammoniumoksalat, dimetyl sulfoksid (DMSO) og vandig kaliumhydroksid (KOH). Det ble isolert arabinogalaktaner bundet til de høyt forgrenete rhamnogalaturonankjernene fra en vannfraksjon. Fra oksalatfraksjonen ble det isolert en arabinanrik pektinkomponent. Xylanrike polysakkarider ble isolert fra en kaliumhydroksidfraksjon. Identifikasjon av komponentene var basert på monosakkaridsammensetning, IR, og NMR (Capek et al. 2003).

Et polysakkaridkompleks ble oppnådd ved felling av vannekstraktet med etanol. Kromatografering av dette komplekset over DEAE-Sephacel ga seks fraksjoner ved trinnvis eluering med vann (A1), natriumkloridløsninger av økende konsentrasjoner (A1-A5) og natriumhydroksidløsning (A6). Analyse av sammensetningen og metyleringen, samt ^{13}C -NMR, indikerte arabino-3,6-galaktan som hovedkomponent i A1-, arabinogalaktaner bundet til rhamnogalakturonankjeder i A2-, A3-, og A4-, og arabinogalaktantype polysakkarider i A5- og A6- fraksjoner. Uronsyre ble funnet i alle fraksjonene, og deres innhold varierte fra 4.7 til 23.8 % (Capek og Hribalova 2004).

Det ble isolert polysakkarider som inneholder pektisk arabino- (1→3,6)-galaktaner, (1→3,5)-arabinan, stivseliknende α -glukaner og xylaner fra to vannløselige fraksjoner fra vannekstrakt av den overjordiske delen til salvie. Identifikasjonen var basert på NMR-spektroskopi og metyleringsanalyse (Ebringerova et al. 2003).

Biologiske/ Farmakologiske aktiviteter

Antioksidantaktivitet

1) Aktive komponenter:

Fra en rekke forsøk er det vist at ekstrakter av salviekrydder har et høyt totalt fenolisk innhold, med hovedsakelig rosmarinsyre og carnosinsyre, samt flyktige komponenter og flavonoider. Det er vist god korrelasjon mellom det totale fenoliske innholdet og antioksidant egenskaper til salvie, hvilket tyder på at fenoliske komponenter er viktige for antioksidantaktiviteten (Dorman et al. 2003; Shan et al. 2005).

Cuvelier et al. (1996) studerte sammenhengen mellom antioksidantaktiviteten og sammensetningen til salvie, og fant at carnosinsyre, carnosol (fig. 6) og rosmarinsyre (fig. 8) hadde høyest antioksidantaktivitet, etterfulgt av kaffesyre (fig.8), rosmanol, rosmadial (fig. 6), genkwanin, og cirsimaritin (fig.12). Antioksidantaktiviteten ble målt ved akselerert autoksidasjon av metyllinoleat (ved 110 °C og intensiv gjennombobling av oksygen).

Fra en annen studie ble fenoliske komponenter testet på evnen til å inhibere oksidasjon av LDL (low-density lipoprotein) mediert av endotelceller fra human aorta. Resultatet viste at alle antioksidantene gav en doseavhengig inhibering av LDL-oksidasjon i konsentrasjon 0.31 til 2.50 μM (tabell 2). Carnosol, carnosinsyre, og rosmarinsyre var de mest potente i dette systemet med IC_{50} -verdier på henholdsvis 0.33, 0.81 og 0.74 μM (tabell 3). På dette grunnlaget ble det antatt at disse forbindelsene kan ha fordeler for menneskehelsen, for eksempel ved forebygging av aterosklerose (Pearson et al. 1997):

Tabell 2: Inhibering av celle-mediert LDL oksidasjon av plantefenoler.

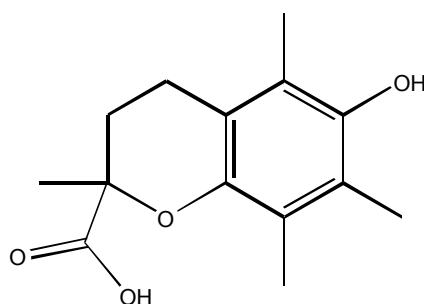
Konsentrasjon (μM)	% inhibering av dannelse av konjugerte diener		
	Carnosinsyre	Carnosol	Rosmarinsyre
0.16	31.1 \pm 3.8	1.2 \pm 0.6	-
0.31	51.5 \pm 3.4	8.1 \pm 2.6	10.8 \pm 4.8
0.63	63.1 \pm 0.5	43.9 \pm 0.5	48.5 \pm 3.8
1.25	91.8 \pm 0.5	78.4 \pm 6.5	86.2 \pm 2.1
2.50	97.6 \pm 3.2	97.3 \pm 1.6	94.5 \pm 4.1
5.00	93.2 \pm 2.6	89.3 \pm 2.5	88.4 \pm 3.5

- : ble ikke testet.

Tabell 3: Konsentrasjon for 50 % hemming av celle-mediert LDL oksidasjon av plantefenoler.

Forbindelse	IC ₅₀ (μM)
Carnosol	0.33
Carnosinsyre	0.81
Rosmarinsyre	0.74

Wang et al. isolerte og identifiserte ti fenoliske forbindelser fra butanolfraksjon av salviebladekstrakter. Disse ble testet for evnen til å scavenge DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)-radikal og radikalkationet 2,2'-azinobis (3-etylbenzotiazolin-6-sulfonsyre) (ABTS⁺). Blant forbindelsene ble rosmarinsyre og luteolin-7-glukosid (fig. 13) funnet som de mest aktive. Rosmarinsyre og luteolin-7-glukosid målt i konsentrasjon 20 μM hadde evnen til å scavenge henholdsvis 88.2 og 62.0 prosent DPPH (0.1 μM) (tabell 4). Antioksidantenes relative evne til å scavenge radikalkationet ABTS⁺ ble målt i vannfase. En standard mengde av trolox (en syntetisk vannløselig vitamin E-analog) (fig. 15) ble sammenliknet.



Trolox

Fig. 15: Strukturen til trolox

Aktiviteten til forbindelsene ble uttrykt som trolox-ekvivalent (TEAC); konsentrasjonen til en troloxløsning i mM (millimolar) som har en antioksidantaktivitet ekvivalent med en 1.0 mM løsning av testsubstansen. I denne testen var også rosmarinsyre og luteolin-7-glukosid de mest aktive antioksidantene, med henholdsvis 5.07 og 4.80 mM trolox-ekvivalenter (tabell 4) (Wang et al. 1998).

Tabell 4: Scavenging effekt til antioksidanter på DPPH- og ABTS⁺-radikal.

Forbindelse	Trolox ekvivalent (mM)	DPPH-scavenging i %
Rosmarinsyre	5.07	88.2
Luteolin-7-glukosid	4.80	62.0

Året etter rapporterte Wang et al. (1999) at tre nye fenoliske glykosider, (2), (3) og (4) (fig. 11), ble isolert og identifisert fra butanolfraksjonen av salviebladekstrakter. Disse ble testet for antioksidantaktivitet med hensyn til å scavenge DPPH-radikal og radikalkationet ABTS⁺. I DPPH-metoden viste

forbindelsene (2) og (3) moderat aktivitet, med IC_{50} -verdier på henholdsvis 30.1 og 19.8 μM . I ABTS^{•+}-metoden ble antioksidantaktiviteten til forbindelsene, (2), (3) og (4), sammenliknet med trolox. Alle tre forbindelsene viste antioksidantaktivitet med troloxequivalent på henholdsvis 3.70, 3.86 og 0.78 mM (tabell 5).

Tabell 5: Scavenging effekt til antioksidanter på DPPH- og ABTS^{•+}-radikal.

Forbindelse	DPPH-scavenging IC_{50} (μM)	Trolox ekvivalent (mM)
(2)	30.1	3.70
(3)	19.8	3.86
(4)	-	0.78

(2): 6-kaffeoyl- β -D-fruktofuranosyl-(2 \rightarrow 1)- α -D-glukopyranosid

(3): 1-O-kaffeoyl- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopyranosid

(4): 1-O-p-hydroksybenzoyl- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopyranosid

Videre gransking av butanolfraksjon av salvieekstrakt førte til isolering og identifisering av ytterligere tre glykosider (5), (6) og (7) (fig. 11), sammen med tre kjente forbindelser: p-hydroksybenzoesyre, (-)-hydroksyjasmonsyre (fig. 10) og kaffesyre (fig. 8). Disse forbindelsene ble testet for antioksidantaktivitet med hensyn til DPPH-scavenging. Alle forbindelsene, målt i konsentrasjon 30 μM , viste evnen til å scavenge DPPH-radikal, men kaffesyre var den mest aktive forbindelsen (tabell 6).

Tabell 6: DPPH-scavenging i % av antioksidanter i konsentrasjon 30 μM .

Forbindelse	DPPH-scavenging i %
(5)	45.7
(6)	28.8
(7)	44.2
p-hydroksybenzoesyre	32.7
(-)-hydroksyjasmonsyre	31.0
kaffesyre	93.2

(5): 1-O-(2,3,4-trihydroksy-3-metyl)butyl-6-O-feruloyl- β -D-glukopyranosid

(6): Etyl β -D-glukopyranosyl tuberonat

(7): 4-hydroksyacetofenon-4-O-[5-O-(3,5-Dimetoksy-4-hydroksybenzoyl)- β -D-apiofuranosyl]-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopyranosid

Det ble funnet i DPPH-radikalscavenging test at antioksidantaktiviteten til rosmarinsyre (EC_{50} = 2,7 $\mu g/ml$) kan sammenliknes med den til askorbinsyre (Lamaison et al. 1991, referert av Baricevic og Bartol 2000).

Carnosinsyre, carnosol og rosmarinsyre er generelt sett kjent for å beskytte celler og vev mot oksidativt stress (Haraguchi et al. 1995). Munne-Bosch et al. rapporterte at carnosinsyre har en antioksidativ funksjon i salvieblader som ble utsatt for tørke, under vekstbetingelser i Middelhavsområdet. Det ble observert at carnosinsyre ble oksidert til rosmanol og isorosmanol (fig. 7) i kloroplastene, hvilket kan tyde på at carnosinsyre scavenger reaktive oksygenspecies *in vivo*

(Munne-Bosch et al. 2001). Videre undersøkelse på carnosinsyres rolle hos salvieplanter som ble utsatt for tørke, bekreftet dens beskyttende rolle på fotosyntetiske membraner mot oksidativ skade. Det ble dessuten funnet at den antioksidative aktiviteten er et samarbeid mellom carnosinsyre og α -tokoferol. Det antas også at carnosinsyre kan beskytte α -tokoferol indirekte ved å scavenge singlett oksygen og lipidperoksyldradikaler (Munne-Bosch og Alegre 2003).

Rosmarinsyre og dets oligomere derivater, salvianolsyre K, salvianolsyre I, sagekumarin og sagerinsyre (fig. 9), i konsentrasjon 5 $\mu\text{g/ml}$ er rapportert å vise utmerket evne til å scavenge DPPH, med omtrent 90 % scavenget DPPH under eksperimentelle betingelser. Disse resultatene avviker så sterkt fra andre (inkludert våre målinger) at de muligens kan bero på en trykkfeil i artikkelen (Lu og Foo 2001a). Kaffesyre og trolox ble brukt som referanser. Aktiviteten til disse fenoliske syrene var omtrent lik den til kaffesyre, men signifikant bedre enn den til trolox. I denne studien ble også flavonoidglykosider (fig. 13) i konsentrasjon 5 $\mu\text{g/ml}$ testet på evnen til å scavenge DPPH. Blant de testede flavonoidene ble antioksidantaktiviteten redusert i følgende rekkefølge: 6-hydroksyluteolin 7-glykosider > luteolin-7-glykosider > luteolin-3'-glykosider > apigenin glykosider. Flavonoidglykosidene viste svakere antioksidantaktivitet på vektbasis, sammenliknet med de fenoliske syrene. Videre ble polyfenolene testet for evnen til å scavenge superoksidradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Forbindelsenes evne til å scavenge superoksidradikal ble målt ved å bruke xanthin/xanthinoksidase system. Aktiviteten blir uttrykt som superoksid-dismutase-ekvivalenter (SOD enheter/mg). I denne testen viste salvianolsyre K og I høyest aktivitet med henholdsvis 280 og 290 SOD enheter/mg. Flavonoidglykosidene viste svak til moderat aktivitet, men likevel bedre enn den til trolox (tabell 7).

Tabell 7: Superoksidradikalscavenging til polyfenoler som SOD-ekvivalenter (enheter/mg)

Forbindelse	SOD (enheter/mg)	Forbindelse	SOD (enheter/mg)
Kaffesyre (ref.)	260	Luteolin-7-glukosid	95
Rosmarinsyre	230	Luteolin-7-glukuronid	80
Salvianolsyre K	280	Luteolin 3'-glukuronid	20
Salvianolsyre I	290	6-hydroksyluteolin-7-glukosid	176
Sagekumarin	220	Apigenin 6,8-di-C-glukosid	18
Sagerinsyre	242	Trolox (ref.)	15

Tilslutt ble antioksidantaktiviteten til polyfenolene evaluert med fosfomolybdenmetoden. Denne metoden er basert på reduksjon av Mo(VI) til Mo(V) av antioksidanter og dannelse av et grønt fosfat/ Mo(V) -kompleks med maksimum absorbans ved 695 nm. Aktiviteten til polyfenolene blir uttrykt i forhold til trolox. I denne testen viste de fenoliske syrene bedre aktivitet enn kaffesyre og trolox på molarbasis. De fenoliske syrene viste også bedre aktivitet

enn trolox på vektbasis, men bare omtrent halvparten av den til kaffesyre (tabell 8) (Lu og Foo 2001a).

Tabell 8: Antioksidantaktivitet til polyfenolene i forhold til trolox (fosfomolybdenmetoden)

Forbindelse	A _m	A _w	Forbindelse	A _m	A _w
Kaffesyre (ref.)	3.0	4.1	Luteolin-7-glukosid	1.3	0.7
Rosmarinsyre	3.7	2.6	Luteolin-7-glukuronid	-	-
Salvianolsyre K	4.4	2.1	Luteolin 3'-glukuronid	1.6	0.9
Salvianolsyre I	4.4	2.0	6-hydroksyluteolin-7-glukosid	2.2	1.1
Sagekumarin	5.2	2.4	Apigenin 6,8-di-C-glukosid	0.7	0.2
Sagerinsyre	5.8	2.0	Trolox (ref.)	1	1

A_m= aktivitet i forhold til trolox på molarbasis

A_w= aktivitet i forhold til trolox på vektbasis

Salvianolsyre L har vist signifikant bedre evne til å scavenge frie radikaler enn trolox, kaffesyre og rosmarinsyre i to testsystemer: DPPH-scavenging og superoksid radikal scavenging (tabell 9) (Lu og Foo 2001b).

Tabell 9: Antioksidantaktivitet til salvianolsyre L

Forbindelse	DPPH (IC ₅₀)	SOD (enheter/mg)
Salvianolsyre L	0.09	300
Trolox	0.48	15
Kaffesyre	0.24	260
Rosmarinsyre	0.21	230

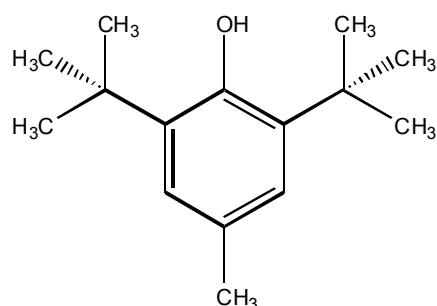
Zupkó et al. studerte antioksidantkapasiteten til 11 europeiske *Salvia*-arter, deriblant *S. officinalis*, i to forskjellige biologiske systemer av lipidperoksidering (LP). For å kunne si noe om sammenhengen mellom aktiviteten og den kjemiske sammensetningen til ekstraktene, ble potensielle aktive komponenter kvantifisert. Resultatet viste at metanolekstrakt av salvieblader var mer effektiv enn α -tokoferol til å beskytte mot lipidperoksidering i enzym-avhengig (NADPH-avhengig LP i rottelever mikrosomer) og enzym-uavhengig (autoksidasjon av standard oksehjerne homogenat) system. IC₅₀-verdien til salvieekstraktet var henholdsvis 2.70 og 8.98 μ g/ml i enzym-avhengig og enzym-uavhengig lipiperoksidering, mens α -tokoferol hadde henholdsvis IC₅₀-verdier på 148.5 og 201.7 μ g/ml (tabell 10). Metanolekstraktet til salvie ble deretter kvantitativt analysert med hensyn til noen komponenter som allerede har blitt rapportert å utøve antioksidantaktivitet: rosmarinsyre og kaffesyre. Totalt flavonoid og totalt fenolisk innhold ble også kvantifisert. Resultatet viste at den totale mengden av fenoliske komponenter var høyere enn summen av rosmarinsyre, kaffesyre og flavonoider, hvilket

indikerte tilstedeværelse av mange andre fenoliske komponenter i ekstraktet. Sammenlikning av aktiviteten til ekstraktet med totalt fenolisk innhold viste en relativ god korrelasjon i tilfellet med enzym-uavhengig system. Derimot ble det ikke funnet liknende sammenheng for det enzym-avhengige systemet. Forfatterne konkluderte at en enkel scavengeraktivitet kan ha funnet sted i det enzym-uavhengige systemet, mens det kan ha vært forskjellige forbindelser med forskjellige LP-hemmende aktivitet i ekstraktet, eller en synergisme av de aktive komponentene i det enzym-avhengige systemet (Zupkó et al. 2001).

Tabell 10: IC₅₀-verdi for salvieekstrakt og α -tokoferol i enzym-avhengig og enzym-uavhengig LP.

Prøve	Enzym-avhengig LP IC ₅₀ -verdi ($\mu\text{g/ml}$)	Enzym-uavhengig LP IC ₅₀ -verdi ($\mu\text{g/ml}$)
Salvieekstrakt	2.70	8.98
α -tokoferol	148.5	201.7

Miura et al. rapporterte at diklormetaneekstrakt av salvieblader og dets diklormetanfraksjon hadde merkbart høyere antioksidantaktivitet enn α -tokoferol, målt med OSI (oljestabilitet indeks)- metoden ved bruk av metyllinoleat i silikonolje ved 90 °C. Ekstraktene ble målt i konsentrasjon 0.02 %. Aktiviteten ble uttrykt i timer ved denne metoden. BHT (butylert hydroksytoluen) (fig. 16) og α -tokoferol var referansesubstanser i dette systemet.



BHT (butylert hydroksytoluen)

Fig. 16: Strukturen til BHT

Antioksidantaktiviteten til etylacetatfraksjonen var sammenliknbar med aktiviteten til α -tokoferol (tabell 11). DCM-ekstraktet ble så rensset ved gjentatt kromatografi over silikagel og Sephadex LH-20, og førte til isolering av kjente forbindelser: carnosol, isorosmanol, columbaridion, carnosinsyre, 12-O-metyl carnosinsyre, rosmanol, epirosmanol, galdosol, atuntzensin A, rosmadial, miltirone og tre nye apianan terpenoider (fig. 4). Dessuten ble det isolert en ny forbindelse: 12-O-metyl carnosol (fig. 7). Fra samme ekstraktet ble det isolert 5 kjente flavonoider: genkwanin, hispidulin, cirsimaritin, 5-hydroksy-7,4'-dimetoksy flavon og salvigenin (fig. 12). DCM-fraksjonen ble også rensset på

samme måte som beskrevet over, og førte til isolering av 4 flavonoider: apigenin, hispidulin, luteolin og eupafolin (fig. 12). Antioksidantaktiviteten til de isolerte forbindelsene ble undersøkt med hensyn til evnen til å stabilisere metyllinoleat i silikonolje ved 90 °C og til å scavenge DPPH. I OSI-metoden viste carnosol, isorosmanol, carnosinsyre, rosmanol, epirosmanol og galdosol, sterk aktivitet, som er sammenliknbar med den til α -tokoferol. Aktiviteten til miltiron, atuntzensin A, og eupafolin var omtrent lik den til BHT (tabell 12). I DPPH-metoden viste carnosol, isorosmanol, carnosinsyre, rosmanol, epirosmanol, galdosol, luteolin og eupafolin, målt i konsentrasjon 31.5 μ M, aktivitet som er sammenliknbar med den til α -tokoferol og L-askorbinsyre (tabell 13). Fra denne studien ble det konkludert at polare fraksjoner og forbindelser var mindre effektive enn fraksjoner og forbindelser av mindre polaritet målt med OSI-metoden (Miura et al. 2002).

Tabell 11: Antioksidantaktivitet til ekstrakter og fraksjoner av salvie målt med OSI-metoden

Ekstrakt/Fraksjon	OSI (timer)
DCM-ekstrakt	68
DCM-fraksjon	70
EtOAc-fraksjon	40
α -tokoferol (ref.)	42
BHT (ref.)	35

Tabell 12: Antioksidantaktivitet til forbindelser isolert fra salvie målt med OSI-metoden.

Forbindelse	OSI (timer)
Carnosol	55
Isorosmanol	48
Carnosinsyre	50
Rosmanol	52
Epirosmanol	45
Luteolin	24
Galdosol	50
Eupafolin	23
BHT (ref.)	25

Tabell 13: DPPH-radikalscavengingaktivitet til forbindelser i konsentrasjon 31.5 μ M.

Forbindelse	Radikalscavenging i %
Carnosol	65
Isorosmanol	65
Carnosinsyre	40
Rosmanol	55
Epirosmanol	35
Galdosol	72
Luteolin	85
Eupafolin	75
α -tokoferol (ref.)	45* og 65*
L-askorbinsyre (ref.)	40* og 70*

*For referansesubstansene er målingene gjort to ganger med forskjellig resultat.

Choi et al. undersøkte evnen til å scavenge peroksynitritt hos 28 europeiske planter, deriblant salvie. Det ble funnet at salvieekstrakt i konsentrasjon 5,0 µg/ml hadde evnen til å fange omtrent 84 % peroksynitritt (10 µM) (Choi et al. 2002).

Lo et al. (2002) rapporterte at carnosinsyre, carnosol og rosmarinsyre viste sterkere evne til å scavenge DPPH-radikal enn vitamin C og E. IC₅₀-verdien for DPPH-scavenging til carnosinsyre, carnosol og rosmarinsyre var henholdsvis 0.60, 0.59, og 0.49 µM. Vitamin C hadde IC₅₀-verdi på 6.0 µM (tabell 14). For vitamin E ble det ikke funnet IC₅₀-verdi, fordi aktiviteten var for lav. Resultatene i denne artikkelen stemmer svært dårlig overens med Miura et al. (2002). Ulik utførelse av DPPH-assayet kan kanskje være en forklaring, selv om våre egne målinger stemmer dårlig med Lo et al. (Malterud, pers. meddel.)

Tabell 14: Radikalscavengingaktivitet for carnosinsyre, carnosol og rosmarinsyre.

Forbindelse	IC ₅₀ (µM) for DPPH-scavenging
Carnosinsyre	0.60
Carnosol	0.59
Rosmarinsyre	0.49
Vitamin C	6.0

Dorman et al. (2003) bestemte den totale fenoliske konsentrasjonen av fenoliske forbindelser til vannekstrakter av utvalgte planter fra Lamiaceae, deriblant salvie. I denne undersøkelsen ble plantematerialet ekstrahert med vann ved hjelp av en enkel prosedyre uten bruk av organiske løsningsmidler, der flyktige fraksjoner med monoterpenderivater ble fjernet. Diterpener ble heller ikke ekstrahert fra plantematerialet. Ekstraktene ble testet på evnen til å redusere Fe(III) til Fe(II) (FRAP; ferric reducing ability of plasma), evnen til å scavenge DPPH, ABTS [2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonsyre) diammonium salt]- og OH[•] (hydroksylradikal), samt evnen til å hemme kobberindusert oksidasjon av human LDL *ex vivo*. Resultatet viste at salvie hadde et høyt totalt fenolisk innhold på 166 mg GAE (gallesyreekvivalenter)/g, med rosmarinsyre som hovedkomponent. Vannekstraktet til salvie viste god antioksidantaktivitet i alle testene fra denne undersøkelsen (tabell 15-17).

Tabell 15: Radikalscavenging aktivitet til vannekstrakt av salvie på DPPH og OH-radikaler.

Prøve	DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	OH IC ₅₀ (µg/ml)
Salvieekstrakt	265.8 ± 7.6	2158.8 ± 70.0

Tabell 16: Radikalscavenging aktivitet til vannekstrakt av salvie på ABTS^{•+}-radikaler

Prøve	ABTS ^{•+} (TEAC, mM Trolox)			
	1 min	4 min	6 min	10 min
Salvieekstrakt	11.5±0.9	13.3±0.9	14.2±1.0	15.5±0.9

Tabell 17: Lag-time for LDL-oksidering, beskyttelse ved tilsetning av vannekstrakt av salvie, sammenliknet med kontroll (fortynnet LDL-fraksjon og kobberindusert oksidasjon).

Prøve	Konsentrasjon	Lag-time (min)
Kontroll	-	90
Salvieekstrakt	0.98 µg/ml	120
Salvieekstrakt	2.45 µg/ml	220

–: uten tilsetning av salvieekstrakt

Antioksidantaktiviteten til aceton- og metanolekstrakter av skudd og røtter, og uddifferensierte (celle og callus) kulturer fra salvie, samt skudd og røtter fra salvieplanter gjenskapt *in vitro* fra skudd og røtter, ble sammenliknet. Aktiviteten ble testet på tre forskjellige *in vitro* modeller: DPPH-scavenging, reduksjon av fosfomolybdat (fosfomolybdenmetoden) og hemming av Fe²⁺-askorbat indusert lipid peroksidering (LP) (Grzegorzczak et al. 2007). Fra DPPH-metoden viste røtter fra *in vitro* planter og hårete rotkulturer ekstrahert med metanol høyest aktivitet, med henholdsvis IC₅₀-verdier på 18.4 og 20.4 µg/ml (tabell 18). Disse ekstraktene, målt i konsentrasjon 50 µg/ml, reduserte henholdsvis 94 og 88 % DPPH-radikal etter inkubasjonstid på 30 minutter (tabell 19). I LP-metoden viste acetonekstrakt av salvieskudd, målt i konsentrasjon 100 µg/ml, høyest aktivitet med hemmende effekt på 70-78 %. Resultatet viste at acetonekstraktene var mest potent i LP-metoden, mens metanolekstraktene viste sterkere antioksidantaktivitet i DPPH-metoden. Grunnen til at acetonekstraktene hemmet lipidperoksidering bedre enn metanolekstraktene kan antakelig være at mindre polare forbindelser ekstrahert med aceton har bedre evne til å interagere direkte med fettsyremolekylene og dermed kan bryte kjedereaksjonen. Både metanol- og acetonekstraktene i konsentrasjon 50 µg/ml viste kraftig antioksidantaktivitet i fosfomolybdenmetoden. Men metanolekstraktene viste bedre evne til å redusere Mo (molybden) enn acetonekstraktene (Grzegorzczak et al. 2007).

Skudd fra *in vivo* og *in vitro* planter, samt fra kulturer ekstrahert med metanol og aceton viste ganske lik aktivitet. Det ble funnet carnosinsyre og carnosol fra acetonekstrakt av skuddene, mens metanolekstraktene inneholdt rosmarinsyre, carnosinsyre og carnosol. Dette kan tyde på at carnosinsyre og carnosol er viktigere i fosfomolybdenmetoden enn i DPPH-metoden. Det kom også fram at metanolekstraktene inneholdt høyere totalt fenolisk innhold enn acetonekstraktene uttrykt som GAE (gallesyreekvivalenter) i mg/g. Dataene fra denne studien viste at organkulturer, særlig hårete rotkulturer til salvie viste høy antioksidantaktivitet sammenliknet med røtter og skudd fra salvie som ble samlet inn fra feltet. Ut fra disse resultatene kan *in vitro* kulturer være en potensiell kilde til naturlige antioksidanter, som ikke blir påvirket av eksogene vekstregulatorer (Grzegorzczak et al. 2007).

Tabell 18: Konsentrasjoner til MeOH- og aceton-ekstrakter fra *in vivo* og *in vitro* plantematerialer som scavenger 50 % DPPH (Grzegorzczak et al. 2007).

Plantematerial	MeOH-ekstrakt IC ₅₀ -verdi (µg/ml)	Aceton-ekstrakt IC ₅₀ -verdi (µg/ml)
Skudd fra <i>in vivo</i> planter	23.2 ± 3.3	62.5 ± 8.5
Skudd fra <i>in vitro</i> planter	39.6 ± 6.6	61.8 ± 9.1
Skudd fra kulturer	70.1 ± 4.0	144. ± 8
Røtter fra <i>in vivo</i> planter	32.5 ± 4.1	> 5000
Røtter fra <i>in vitro</i> planter	18.4 ± 5.5	> 1000
Hårete rotkulturer	20.4 ± 4.2	169 ± 1
Calluskulturer	81.7 ± 2.8	> 5000
Suspensjonkulturer	34.1 ± 2.7	178 ± 1

Tabell 19: Prosentvis hemming av DPPH-radikal.

Plantematerial (50 µg/ml)	% hemming	% hemming
Skudd fra <i>in vivo</i> planter	81.4 ± 0.8	39.6 ± 2.8
Skudd fra <i>in vitro</i> planter	72.3 ± 2.2	29.5 ± 0.2
Skudd fra kulturer	39.2 ± 0.04	24.3 ± 1.9
Røtter fra <i>in vivo</i> planter	69.8 ± 0.06	3.16 ± 0.87
Røtter fra <i>in vitro</i> planter	94.4 ± 4.0	5.38 ± 0.36
Hårete rotkulturer	88.1 ± 3.0	14.3 ± 0.1
Calluskulturer	23.8 ± 1.0	5.70 ± 1.04
Suspensjonkulturer	57.6 ± 0.4	14.3 ± 0.2

2) Antioksidantaktivitet til salvieekstrakt på lipider og lipidholdige matvarer:

Det har blitt gjort en rekke studier på salviens evne til å beskytte lipider og lipidholdige matvarer mot peroksidering. Det er funnet at carnosinsyre har evnen til å stabilisere tokoferoler under lagring. Degradering av α- og γ-tokoferol ble redusert når carnosinsyre ble tilsatt (Ternes og Schwarz 1995).

Metanolekstrakt av salvie har vist lavere antioksidantaktivitet enn BHT på evnen til å stabilisere naturlig peanøttolje oppbevart ved 80 °C i 24 timer. Oksidasjonshastigheten til peanøttolje ble fulgt ved å måle peroksidverdier (Özcan 2003).

Fra en annen studie ble aktiviteten til etanolekstrakt av salvie sammenliknet med BHT ved hjelp av Rancimat-metoden utført på flekk. Metoden går ut på å teste antioksidantenes evne til å stabilisere flekk ved følgende betingelser: 100 °C, oksygen gjennombløsing = 200 ml/min. Resultatet viste at salvieekstrakt (0.01%) hadde god antioksidantaktivitet med evnen til å stabilisere flekk i 7.7 timer. Fraksjonering av salvieekstrakt over silikagelkolonne ga fire fraksjoner. Den andre fraksjonen av salvieekstraktet (0.002 % wt.) viste halvparten av

aktiviteten til BHT (0.025 %) ved 12,5 ganger høyere konsentrasjon med evnen til å stabilisere flekk i henholdsvis 5 og 11.45 timer (Sekretár et al. 2004).

Antioksidantaktiviteten til oleoresin fra acetonekstrakt av salvieblader og blomster samt metanol/vannekstrakt av oleoresinet ble testet i rapsfrøolje målt i konsentrasjon 0,1 % ved 80 °C etter eksponering for UV-stråling i 30 minutter. BHT ble sammenliknet. Resultatet viste at aktiviteten til BHT (0.02 %) var mye lavere enn den til salviefraksjoner ved 80 °C. Dataene fra denne studien viste at alle salvieekstraktene og deres fraksjoner hadde sterk antioksidantaktivitet, med beskyttende faktor (PF= protection factors) over 3 (Bandoniene et al. 2001).

Salvieekstrakter hvor flyktige komponenter var fjernet og salvieekstrakt i konsentrasjon 0,1 % har vist å være mer effektive i stabilisering av rapsfrøolje ved oppbevaring ved 80 °C enn ved 120 °C. BHT (0.02 %) viste dårligere evne til å stabilisere rapsfrøolje enn salvieekstraktene. Antioksidantaktiviteten ble målt ved hjelp av Rancimat-metoden (120 °C) og Schaal ovn test (80 °C). Schaal ovn test går ut på å varme opp prøven ved høye temperaturer inntil den harskner, slik at lukt og smak endres eller inntil den når et passende endepunkt basert på peroksidverdier (Bandoniene et al. 2002).

Antioksidantaktiviteten til ren carnosol og carnosinsyre ble bestemt i rapsfrøolje under betingelsene i OXIPRES-apparat ved 100 °C. Ved denne metoden måles forbruk av oksygen ved oksidering under høyt trykk. Aktiviteten til carnosol viste seg å være moderat høyere enn den til carnosinsyre. Videre i denne studien ble det funnet at bladekstrakter av salvie i løsningsmidler av medium polaritet (etylacetat) ga høyest utbytte av ekstrakt og carnosinsyre. Ekstraktet (0,05 %) ble testet for antioksidantaktivitet i rapsfrøolje, solsikkeolje og flekk under betingelsene i OXIPRES-apparat ved 100 °C og i Schaal ovn test ved 40 og 60 °C. Aktiviteten, uttrykt som beskyttende faktor (PF), var lavere i OXIPRES-test enn i Schaal ovn test. I OXIPRES-testen ble dessuten BHT brukt som referanse, og det viste seg at etylacetatekstraktet til salvie hadde litt høyere aktivitet enn BHT i rapsfrøolje, med henholdsvis 0,51 og 0,48 PF (Trojakova et al. 2001).

Antioksidantaktiviteten til salvieekstrakt enten løst i etanol eller homogenisert med olivenolje som bærer, ble undersøkt i salatdressing. BHT ble gjort i stand på samme måte som salvieekstraktene. Disse prøvene ble oppbevart i mørket ved romtemperatur og ved 40 °C, og ved eksponering for lys ved romtemperatur. Resultatet viste at salvieekstrakt (600 ppm) homogenisert i olivenolje hadde høyere antioksidantaktivitet enn tilsvarende konsentrasjon i etanolløsning, og sammenliknbar med den til BHT (300 ppm) i prøvene oppbevart i mørket ved romtemperatur og ved 40 °C. I salatdressing som ble utsatt for lys ved romtemperatur ble det funnet at salvie homogenisert i olivenolje viste pro-oksidant effekt, og denne effekten var sterkere enn den til

salvie løst i etanol. Videre i denne studien ble aktiviteten til henholdsvis salvieekstrakt og BHT kapslet inn i liposomer (ved mikrofluidisasjon eller ultralyd) undersøkt i salatdressing ved oppbevaring i mørket ved 40 og 60 °C. Resultatet viste at salvieliposomer laget ved mikrofluidisasjon hadde sterk antioksidantaktivitet, sammenliknbar med den til BHT, i salatdressing oppbevart i mørket ved 40 °C. Ved 60 °C, var derimot alle liposomene in-effektive (Abdalla og Roozen 2001).

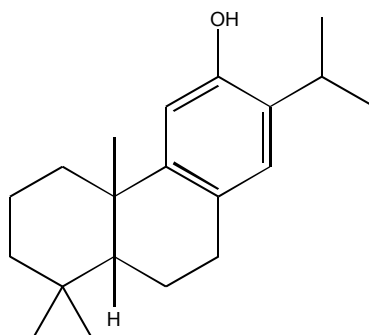
Nylig rapporterte Estévez et al. at den eteriske oljen til salvie har evnen til å beskytte leverpaté mot oksiderende prosesser i høyere grad enn BHT, og kan dermed være et alternativ til syntetiske antioksidanter som BHT (Estévez et al. 2007).

Variasjonen i antioksidantaktivitet hos ulike planter og krydder i ulike matvarer har blitt observert: Jo mer polare antioksidantene er, desto mer aktive er de i rene lipider, og ikke-polare antioksidanter er mest aktive i et polart substrat, for eksempel olje-i-vann-emulsjon (Frankel et al. 1996; Yanishlieva et al. 2006).

Det er blitt observert at antioksidantaktiviteten og den kjemiske sammensetningen til ekstrakter varierer en god del på grunn av ekstraksjonsprosedyren (for eksempel polariteten til løsningsmidlet som brukes til ekstrahering av plantematerialet) og hvilke systemer de blir testet på (Dapkevicius et al. 1998; Dorman et al. 2003; Velickovic et al. 2003a; Durling et al. 2007; Grzegorzcyk et al. 2007).

3) Struktur-aktivitetsforhold:

Antioksidantaktiviteten til en forbindelse er blant annet knyttet til dens fenoliske struktur. Diterpener av ferruginoltypen (fig. 17) med to orthofenoliske funksjoner og en isopropylgruppe på karbonet ved siden av, er kjent for å være utmerkede antioksidanter. Eksempel på disse forbindelsene er carnosinsyre og carnosol ((Brieskorn og Dömling 1969) refert av (Cuvelier et al. 1994)).



Ferruginol

Fig. 17: Strukturen til ferruginol

Fenoliske syrer, for eksempel hydroksylerte kanelsyrer har vist potent antioksidantaktivitet. Dette kan være tilknyttet evnen til å stabilisere det resulterende frie radikalet ved å delokalisere det uparrede elektronet i konjugerte dobbeltbindinger. Det er foreslått at katekolstruktur er avgjørende for økt antioksidantaktivitet. Polyfenoler fra salvie er som regel kaffesyreoligomere (dimere til tetramere), derfor kan deres sterke evne til å scavenge DPPH-radikal være knyttet til deres katekolstruktur. Kaffesyre, rosmarinsyre og salvianolsyre I og K er eksempler på slike forbindelser (Lu og Foo 2001a; Bors et al. 2004).

Flavonoider (fig. 18) har varierende antioksidantaktivitet, og de som har en katekol B-ring, for eksempel luteolin glykosider, er mer aktive enn de som er foruten, for eksempel apigenin glykosider (Rice-Evans et al. 1996; Lu og Foo 2001a; Miura et al. 2002).

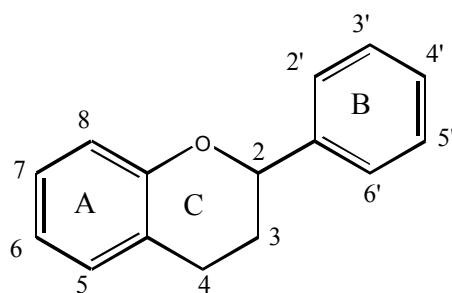


Fig. 18: Flavonoidstruktur

Antiinflammatorisk aktivitet

Den antiinflammatoriske aktiviteten er en felles egenskap hos mange triterpenoider (Mahato et al. 1988). Den antiinflammatoriske aktiviteten til oleanolsyre har blitt rapportert av Gupta et al. (Gupta et al. 1969) og deretter bekreftet i senere studier av Singh et al. (Singh et al. 1992) og Dai et al. ((Dai et al. 1989) referert av (Jie 1995)). Carnosol og ursolsyre har vist sterk antiinflammatorisk og hemmende effekt med hensyn til tumor-initierende aktiviteter i testsystemer på mus. Den steroid-liknende strukturen til ursolsyre og dataene fra studien tyder på at ursolsyre er en potent hemmer av TPA (12-*O*-tetradecanoylforbol-13-acetat)-indusert inflammasjon (Huang et al. 1994).

Baricevic et al. undersøkte den topikale antiinflammatoriske aktiviteten til kloroform-, metanol- og n-heksanekstrakt, samt den eteriske oljen til salvie. Resultatet viste at kloroform- og n-heksanekstraktene viste en doseavhengig inhibering av krotonoljeindusert øreødem på mus. Metanolekstraktet viste veldig lav aktivitet, og den eteriske oljen var inaktiv. Kloroformekstraktet og dets

fraksjoner var mest aktivt, med ursolsyre som hovedkomponent. Kloroformekstraktet induerte 50 % ødemihibering (ID_{50}) i konsentrasjon $105.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Den antiinflammatoriske aktiviteten til ursolsyre ble videre sammenliknet med den til oleanolsyre og det non-steroidale antiinflammatoriske legemidlet (NSAID) indomethacin. ID_{50} -verdien til ursolsyre, oleanolsyre og indomethacin var henholdsvis 0.14, 0.36, og $0.26 \mu\text{M}/\text{cm}^2$, hvilket betyr at ursolsyre var mest potent (tabell 20). Forfatterne konkluderte at ursolsyre kan være viktig for den topikale antiinflammatoriske aktiviteten til salvie (Baricevic et al. 2001).

Tabell 20: Antiinflammatorisk aktivitet til ursolsyre, oleanolsyre og indomethacin (Baricevic et al. 2001)

Substans	Dose ($\mu\text{M}/\text{cm}^2$)	Antall dyr	% Reduksjon	ID_{50} ($\mu\text{M}/\text{cm}^2$)
Ursolsyre	0.00	10	-	0.14
	0.10	10	35.4	
	0.20	10	72.3	
	0.40	10	86.2	
Oleanolsyre	0.00	10	-	0.36
	0.10	14	11.1	
	0.20	14	43.0	
	0.40	12	52.8	
	1.00	11	73.6	
Indometacin	0.00	10	-	0.26
	0.12	10	29.2	
	0.25	20	46.1	
	0.50	10	76.9	

Høye konsentrasjoner av NO (nitrogenmonoksid) blir produsert av iNOS (induserbar NO-syntase) i inflammasjon og i flere trinn i carcinogenese. Når mus makrofag RAW 264,7 cellelinje ble behandlet med carnosol, ble det merkbar reduksjon i LPS (lipopolysakkarid)-stimulert NO-produksjon. Effekten til carnosol var konsentrasjonsavhengig, og IC_{50} -verdien var på $9.4 \mu\text{M}$. Resultatene antydte at carnosol reduserer NO-produksjon og iNOS genekspressjon ved å hemme aktivering av NF- κ B (nukleærfaktor- kapp B), og dette kan være en mulig mekanisme for den antiinflammatoriske effekten. Fra den samme studien ble det funnet at også carnosinsyre og rosmarinsyre har antiinflammatorisk aktivitet, men lavere enn den til carnosol (Lo et al. 2002).

Aktiviteten til carnosinsyre og rosmarinsyre ble undersøkt i en annen studie. Det kom fram at carnosinsyre hadde fire ganger sterkere antiinflammatorisk aktivitet enn rosmarinsyre. Carnosinsyre ($20\text{--}50 \mu\text{M}$) viste antiinflammatorisk potensiale ved å redusere forholdet NO (nitrogenmonoksid)/celleprotein signifikant (Kuhlmann og Röhl 2006).

Antibakterielle og antimikrobielle aktiviteter

Det er rapportert at cirsimaritin har høy antimikrobiell aktivitet mot *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermitis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, og *Pseudomonas aeruginosa*. Luteolin har vist lav antibakteriell aktivitet mot *E. coli*, *K. pneumoniae* og *P. aeruginosa*. Minimum inhiberende konsentrasjon (MIC) og minimum bactericidal konsentrasjon (MBC) for cirsimaritin og luteolin uttrykt i µg/ml ble bestemt ved tube-fortynningsmetoden (tabell 21) (Miski et al. 1983).

Tabell 21: Antibakteriell aktivitet til cirsimaritin og luteolin.

Flavonoid	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
Cirsimaritin	31.25	125	62.5	125	45	90	45	90	31.5	125	31.5	125
Luteolin					125	500	125	500			125	500

Den antibakterielle effekten til salvie er knyttet til dets høye innhold av thujon og 1,8-cineol (Sivropoulou et al. 1997), men andre komponenter som α -pinen og borneol, samt andre innholdsstoffer i mindre mengder i den eteriske oljen har også antimikrobiell aktivitet. Disse komponentene kan muligens virke synergistiske på hverandre. Den antibakterielle aktiviteten til salviens eteriske olje ble undersøkt ved buljong-mikrofortynning (broth microdilution) på 17 bakteriestammer som er relevante i matkontaminering. Resultatet viste at den eteriske oljen hemmet veksten til *Bacillus cereus*, *B. megatherium*, *B. subtilis*, *Aeromonas hydrophila*, *A. sobria*, og *Klebsiella oxytoca*. Oljen hadde mindre effekter på *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* og *P. aeruginosa* (tabell 22). Den eteriske oljen har generelt sett mer uttalt effekt mot grampositive enn gramnegative bakterier. Hovedkomponentene i den eteriske oljen var α -thujon, 1,8-cineol, kamfer, borneol og β -pinen (Longaray Delamare et al. 2007):

Tabell 22: MIC og MCC (minimum cidal konsentrasjon) til den eteriske oljen til salvie.

Testorganisme	MIC (mg/ml)	MCC (mg/ml)
<i>A. hydrophila</i>	0.5	0.5
<i>A. sobria</i>	0.5	0.5
<i>K. oxytoca</i>	0.1	0.1
<i>B. megatherium</i>	0.5	0.5
<i>B. cereus</i>	0.3	0.4
<i>B. subtilis</i>	0.4	1.0

Tanaka et al. studerte den antibakterielle aktiviteten til 50 ulike eteriske oljer og 24 oleoresiner hos forskjellige planter og krydder, deriblant salvie, mot bakterier som forårsaker øvre luftveisinfeksjoner som, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, og *Moraxella catarrhalis*. Den antibakterielle

aktiviteten til 45 flyktige komponenter ble også testet. Salvieolje viste sterkest antibakteriell aktivitet mot *S. pyogenes* med MIC på 50 µg/ml. Komponentene til den eteriske oljen til salvie ble identifisert ved sammenlikning av deres massespektra og retensjonstid ved hjelp av GC-MS. Kamfer (11.7 %), 1,8-cineol (11.7 %) og α -thujon (37.0 %) ble funnet som hovedkomponentene i den eteriske oljen til salvie. Av de 45 testede flyktige komponentene, viste viridiflorol høyest antibakteriell aktivitet mot *S. pyogenes* og *H. influenzae* med MIC på 25 µg/ml. Men viridiflorol utgjorde bare 1.0 % av den eteriske oljen til salvie. Salvieoleoresin viste svak antibakteriell aktivitet mot *S. pyogenes* med MIC på 400 µg/ml. Forfatterne konkluderte med at hovedkomponentene og komponenter i lave konsentrasjoner i den eteriske oljen til salvie kan virke synergistiske på hverandre og forårsake den antibakterielle aktiviteten. Dessuten viste den eteriske oljen til salvie høyere antibakteriell aktivitet enn salvieoleoresin mot de testede bakteriene (Tanaka et al. 2002).

Velicković et al. undersøkte den antimikrobielle aktiviteten til etanolekstrakter fra blomster, blader og stammer av salvie. Manool ble funnet som hovedkomponenten i ekstraktene. Det viste seg at ekstraktene inneholdt alle de spesifikke komponentene som definerer den kromatografiske profilen til den eteriske oljen. Bladekstraktet inneholdt mye kamfen, limonen, *cis*- og *trans*-thujon, kamfer, bornylacetat og α -humulen. Store mengder α -pinen og 1,8-cineol ble funnet i blomstekstraktet. Linalool fantes mest i stengelekstraktet. Bladekstraktet viste signifikant høyere antimikrobiell aktivitet enn de to andre ekstraktene ved diffusjons- og fortynningsmetoden. Ekstraktene hemmet veksten til *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. lutea* ved lave konsentrasjoner. Derimot var det nødvendig med større mengder ekstrakt for å oppnå den letale effekten hos *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* og *Saccharomyces cerevisiae* (tabell 23) (Velickovic et al. 2003a).

Tabell 23: Verdier for MIC og MLC (µl/ml) til salvieekstrakter.

Testorganisme	CFU/ml av inokulat	Blomster		Blader		Stengler	
		MIC	MLC	MIC	MLC	MIC	MLC
<i>E. coli</i>	56x10 ⁶	80	100	60	80	120	120
<i>S. enteritis</i>	65x10 ⁶	50	60	50	60	80	100
<i>P. aeruginosa</i>	55x10 ⁶	60	100	60	80	100	120
<i>B. subtilis</i>	60x10 ⁶	6	8	6	8	10	12
<i>S. aureus</i>	45x10 ⁶	12	14	10	14	16	18
<i>S. lutea</i>	70x10 ⁶	20	25	20	25	40	50
<i>C. albicans</i>	80x10 ⁶	40	60	40	60	40	50
<i>S. cerevisiae</i>	11x10 ⁶	160	–	180	–	180	–
<i>A. niger</i>	24x10 ⁶	25	50	30	60	30	70

CFU: Colony Forming Units (antall kolonidannende enheter)

MIC: Minimum inhiberende konsentrasjon

MLC: Minimum letal konsentrasjon

- : Ingen letal aktivitet (200 µl/ml)

Samme året studerte forfatterne den kjemiske sammensetningen til den eteriske oljen til salvie ved hjelp av GC-FID og GC-MS analyser. Hovedkomponentene i den eteriske oljen (> 5 %) var cis-thujon, 1,8-cineol, α -humulen, β -pinen og viridiflorol. Den eteriske oljen ble testet på antimikrobiell aktivitet på 9 ulike mikroorganismer ved hjelp av diffusjonsmetoden, og viste hemmende effekt på *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Candida albicans*, *S. cerevisiae* og *Aspergillus niger* (Velickovic et al. 2003b).

I en annen studie, ble det rapportert at salvieekstrakt og to av dets fire fraksjoner viste antibakteriell aktivitet mot *B. subtilis* og *S. aureus*. Metoden som ble anvendt var tre-dimensjonell agar metoden (tabell 24) (Sekretár et al. 2004).

Tabell 24: Antibakteriell aktivitet til etanolløsning av salvieekstrakt og dets fraksjoner uttrykt som inhiberende sone i millimeter (mm).

Testorganisme	Salvieekstrakt	Salviefaksjon 2	Salviefaksjon 3
<i>B. subtilis</i>	4.25	3.13	5.50
<i>S. aureus</i>	6.28	5.18	4.78

Horiuchi et al. rapporterte at råekstraktet til salvie reduserte MIC til aminoglykosider i vancomycin-resistente enterococcer (VRE). Isolering og identifisering av den aktive forbindelsen fra ekstraktet, ga carnosol. Carnosinsyre som har strukturelle likheter med carnosol, og som var kommersielt tilgjengelig, ble også undersøkt for antibakteriell aktivitet. Den antibakterielle aktiviteten til carnosol og carnosinsyre ble testet på 8 ulike bakteriestammer ved hjelp av buljong-mikrofortynningsmetoden. Carnosol og carnosinsyre viste svak antibakteriell aktivitet på grampositive bakterier, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* og *S. aureus* med MIC på 32- 64 $\mu\text{g/ml}$, men ikke på de gramnegative (*P. aeruginosa* og *Serratia marcescens*) (tabell 25). Når carnosol og carnosinsyre ble tilsatt vekstmedium, ble MIC til enkelte aminoglykosider for VRE redusert 8 til 128 ganger eller mer, sammenliknet med MIC målt ved fravær av disse forbindelsene (tabell 26). Den tilsatte konsentrasjonen til carnosol og carnosinsyre var $\frac{1}{4}$ av deres MIC. Dette antyder at carnosol og carnosinsyre i stor grad potencierer den antibakterielle aktiviteten til aminoglykosider på VRE. Fra denne studien ble det også vist at carnosol og carnosinsyre potencierer den antibakterielle effekten til andre antimikrobielle midler som etidiumbromid, erythromycin og tetrasyklin. Dataene viste en mulig mekanisme for denne effekten: Carnosol og carnosinsyre øker permeabiliteten til cellemembranen hos grampositive bakterier, slik at antimikrobielle midler som aminoglykosider lettere kan komme inn i cellene (Horiuchi et al. 2007).

Tabell 25: Antibakteriell aktivitet til carnosol og carnosinsyre

Testorganisme	Carnosol MIC (µg/ml)	Carnosinsyre MIC (µg/ml)	Arbekacin MIC (µg/ml)
<i>E. faecium</i>	64	32	64
<i>E. faecalis</i>	64	32	128
<i>S. aureus</i>	64	32	0.5
<i>P. aeruginosa</i>	>128	>128	-
<i>S. marcescens</i>	>128	>128	-

- : ble ikke testet.

Tabell 26: MIC for antimikrobielle midler på VRE ved fravær og tilsetning av carnosol og carnosinsyre.

Antimikrobiell/ Forbindelse	<i>E. faecium</i> MIC (µg/ml)	<i>E. faecalis</i> MIC (µg/ml)
Arbekacin	64	128
+ carnosol	8	8
+ carnosinsyre	4	8
Gentamycin	64	64
+ carnosol	8	8
+ carnosinsyre	4	16
Streptomycin	256	256
+ carnosol	64	64
+ carnosinsyre	64	64
Etidiumbromid	16	8
+ carnosol	4	4
+ carnosinsyre	2	4
Tetracyklin	128	2
+ carnosol	128	1
+carnosinsyre	64	1

Omar et al. rapporterte at vannekstrakt av salvie viste sterkere inhiberende effekt på *Clostridium perfringens* enn etanolekstraktet. Vannekstraktet og etanolekstraktet inhiberte vekst av *C. perfringens* ved en konsentrasjon på henholdsvis 0.10 og 0.20 mg/ml. For å hemme sporulering og enterotoksinproduksjon av *C. perfringens* var det nødvendig med høyere konsentrasjon. Vannekstraktet hemmet sporulering og enterotoksinproduksjon ved en konsentrasjon på 0.45 mg/ml, mens etanolekstraktet hemmet sporulering og enterotoksinproduksjon ved en konsentrasjon på henholdsvis 0.50 og 0.45 mg/ml. Forfatterne anser denne studien som relevant og viktig, fordi ved behandling eller hindring av en sykdom er det viktig både å drepe patogenet og hemme produksjon av toksiner og andre virulensfaktorer. Matkontaminering av *C. perfringens* er antatt å være et verdensproblem (Omar et al. 2006).

Weckesser et al. studerte den antimikrobielle aktiviteten til ni planteekstrakter, deriblant salvie, mot bakterier og sopp som er relevante ved hudsykdommer. Grampositive *Staphylococcae* og *Streptococcae* fører vanligvis til sårinfeksjoner, kviser, karbunkler, abscesser, impetigo, og erysipelas.

Gramnegative *Enterobacteria* er en del av tarmfloraen. Men utenfor tarmen kan de føre til sårinfeksjoner og sepsis. *Pseudomonas*, en annen gramnegativ stav, er et patogen ved sårinfeksjoner. Grampositive *Corynebacteria* og *Propionebacteria* er bakterier som er en del av hudfloraen. Men *Corynebacteria* kan føre til oppurtunistiske hudinfeksjoner hos immunosuppressive pasienter. *Propionebacterium acnes* kan føre til hudinfeksjon og er en viktig årsak til acne vulgaris. Soppene *Candida albicans* og *Candida krusei* kan finnes på hud og mukusmembraner uten å føre til symptomer. Som opportunistiske patogener kan det bli overvekst av dem på normal hudflora, og dette kan føre til hudsykdommer som intertrigo og kandidiasis hos diabetikere, overvektige og pasienter med svekket immunforsvar. Soppen *Malassezia furfur* som vokser på hudområder rike på talgkjertler er knyttet til patogenesen av seboreisk eksem og flass. I denne studien ble salvieblader ekstrahert med karbondioksid, hvilket førte til at lipofile komponenter som fenoliske diterpenoider ble ekstrahert over i ekstraktet. Salvieekstraktet hemmet veksten til *Staphylococcus epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. pyogenes* gr. A, *S. agalactiae* gr. B, *Bacillus subtilis*, *Corynebactrium amycolatum* og *C. pseudodiphthericum* med MIC på 10-20 µg/ml (tabell 27). Ekstraktet viste bedre hemmende og baktericid effekt på anaerobe bakterier med MIC på 2-20 µg/ml og MBC på 10-100 µg/ml (tabell 28). Den antimikrobielle aktiviteten til carnosinsyre ble også undersøkt. Carnosinsyre viste hemmende effekt på *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* gr. A, *S. agalactiae* gr. B, *B. subtilis*, *C. amycolatum* og *C. pseudodiphthericum* med MIC på 32-64 µg/ml (tabell 29). Mot anaerobe bakterier viste carnosinsyre bedre hemmende og baktericid effekt med MIC og MBC på 16-64 µg/ml (tabell 30). For å oppnå baktericid effekt var det nødvendig med høyere doser. Verken salvieekstraktet eller carnosinsyre viste antimikrobiell aktivitet mot soppene *C. albicans*, *C. krusei* eller *M. furfur*. Metoden som ble anvendt var agar diffusjonsmetoden (Weckesser et al. 2007).

Tabell 27: Minimum hemmende konsentrasjon (MIC) og minimum baktericid konsentrasjon (MBC) til salvieekstrakt på bakterier.

Bakterie	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>S. epidermidis</i>	20	100
<i>S. lugdunensis</i>	20	100
<i>S. pyogenes</i> gr. A	10	100
<i>S. agslactiae</i> gr. B	20	100
<i>B. subtilis</i>	20	100
<i>C. amycolatum</i>	20	100
<i>C. pseudodiphthericum</i>	10	20

Tabell 28: MIC og MBC til carnosinsyre på bakterier.

Bakterie	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>S. aureus</i>	64	64
<i>S. epidermidis</i>	64	128
<i>S. pyogenes</i> gr. A	64	128
<i>S. agslactiae</i> gr. B	64	ikke mulig å vurdere
<i>B. subtilis</i>	64	128
<i>C. amycolatum</i>	64	128
<i>C. pseudodiphthericum</i>	32	128

Tabell 29: MIC og MIB til salvieekstrakt på anaerobe bakterier.

Bakterie	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>Clostridium perfringens</i>	10	10
<i>Propionibacterium acnes</i>	10	100
<i>Bacteroides fragilis</i>	10	20
<i>Bacteroides vulgatus</i>	10	10
<i>Prevotella intermedia</i>	20	20
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	2	10

Tabell 30: MIC og MBC til carnosinsyre på anaerobe bakterier.

Bakterie	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)
<i>Clostridium perfringens</i>	16	16
<i>Propionibacterium acnes</i>	16	32
<i>Bacteroides fragilis</i>	64	64
<i>Bacteroides vulgatus</i>	32	32
<i>Prevotella intermedia</i>	64	64
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	16	32
<i>Peptococcus magnus</i>	32	64

Mot Alzheimer

Alzheimers sykdom (AD; Alzheimer's disease) er en vanlig nevrodegenerativ sykdom som påvirker deler av den eldre befolkningen. Primærsymptomet er hukommelsestap. Nevropatologisk er dette hukommelsestapet knyttet til underskudd av neurotransmitteren acetylcholin (Ach). Primærbehandling er å øke totalnivået av acetylcholin i hjernen, ved å hemme acetylcholinesterase (AchE) som nedbryter acetylcholin. Det finnes en rekke syntetiske legemidler som hemmer AchE. Antioksidant, antiinflammatorisk og østrogen aktivitet er antatt å være relevant i behandling av sykdommer i sentralnervesystemet (CNS) som AD. Ofte vil slike aktiviteter skyldes fenoliske forbindelser, og det er mulig at slike forbindelser kan virke synergistiske (Perry et al. 2000b).

1) Anticholinesterase aktivitet:

Historisk sett har flere *Salvia*-arter blitt anvendt i over 400 år for å bedre hukommelsen. Det er rapportert at denne effekten er knyttet til anticholinesterase aktiviteten til de eteriske oljene og planteekstraktene til salvie (*S. officinalis*) og spansk salvie (*S. lavandulaefolia*) i menneskehjernen. Det er tenkt at *S. lavandulaefolia* som mangler thujon, ville være bedre egnet til å undersøke den hukommelsesøkende effekten enn *S. officinalis* (Perry et al. 1996; Perry et al. 1999; Perry et al. 2000b).

Perry et al. studerte den kolinerge aktiviteten til utvalgte europeiske planter, deriblant salvie, *S. officinalis*. Forfatterne rapporterte at den eteriske oljen til salvie hemmet acetylcholinesterase (AChE) i ulike deler av hjernen – cerebral cortex, striatum og cerebellum med IC₅₀-verdier på henholdsvis 0.07, 0.15 og 0.18 µg/ml. Etanolekstrakt av friske salvieblader viste også god hemmende effekt på AChE, med IC₅₀-verdi på 1,5 mg/ml. De kommersielt tilgjengelige kjemiske komponentene i den eteriske oljen til salvie (borneol, kaffesyre, kamfer, 1,8-cineol og thujon) ble også testet, men ingen av disse viste hemmende effekt på enzymet. Den eteriske oljen til salvie hemmet AChE bedre enn butyrylcholinesterase (BuChE). Spansk salvie (*S. lavandulaefolia*) ble også studert, og dens eteriske olje viste like god evne til å hemme AChE som den til salvie (*S. officinalis*) (Perry et al. 1996).

Savelev et al. studerte anti-AChE aktiviteten til åtte kommersielt tilgjengelige terpenoidforbindelser til spansk salvie, *S. lavandulaefolia*: 1,8-cineol, kamfer, α-pinen, β-pinen, karyofyllenoksid, borneol, linalool og bornylacetat. Potensielle synergistiske og antagonistiske interaksjoner mellom terpenoider ble også studert. Forfatterne fant at 1,8-cineol var mest aktiv blant komponentene med IC₅₀-verdi på 0.05 mg/ml. Par av terpenoider viste synergisme (1,8-cineol sammen med enten α-pinen eller karyofyllen), eller alternativt antagonisme (1,8-cineol sammen med kamfer). En blanding av 6 og 8 terpenoider var mindre potent enn hele den eteriske oljen til spansk salvie. Forfatterne konkluderte med at den observerte AChE-hemmende aktiviteten til den eteriske oljen er et resultat av en kompleks interaksjon av synergistiske og antagonistiske interaksjoner mellom terpenoidene, inkludert uidentifiserte komponenter (Savelev et al. 2003).

Året etter undersøkte forfatterne den hemmende effekten til *S. officinalis* på human erytrocytt BuChE og AChE. Den eteriske oljen til salvie viste tids-avhengig hemming av BuChE (tabell 31), men derimot hurtig hemming av AChE, med IC₅₀-verdi på 0.07 mg/ml ved inkubasjonstid på 5 minutter (tabell 32). Den hemmende effekten til salvie er bedre på AChE enn BuChE. Videre ble hovedkomponentene i den eteriske oljen til salvie (thujon, 1,8-cineol, kamfer,

borneol, og α -caryofyllen) undersøkt. Ingen av forbindelsene hemmet BuChE. 1,8-cineol derimot viste god evne til å hemme AchE ved inkubasjonstid på 5 minutter, med IC₅₀-verdi på 0.06 mg/ml. I denne studien inneholdt den eteriske oljen til salvie 5.4 % 1,8-cineol. Hvis oljen produserte 50 % hemming av human AchE ved sluttkonsentrasjon på 0.07 mg/ml ved inkubasjonstid på 5 minutter (tabell 32), blir tatt som en blanding på 100 %, vil en sluttkonsentrasjon av 5.4 % 1,8-cineol i oljen være 0.0038 mg/ml. Forfatterne konkluderte med at den totale hemmende effekten skyldes ikke skyldes enkeltkomponenter, men hele den eteriske oljen, med mulighet for synergisme blant komponentene (Savelev et al. 2004).

Tabell 31: Hemming av BuChE i forhold til inkubasjonstid

Eterisk olje	<u>IC50 (mg/ml)</u>			
	5 min	30 min	60 min	90 min
Salvie	0.33±0.01	0.24±0.014	0.21±0.017	0.23±0.02

Tabell 32: Hemming av AchE i forhold til inkubasjonstid

Eterisk olje	<u>IC50 (mg/ml)</u>			
	5 min	30 min	60 min	90 min
Salvie	0.07±0.01	0.05±0.014	0.065±0.01	0.08±0.02

På bakgrunn av den tradisjonelle bruken til salvie som styrkemiddel for hjernen og rapporter om *in vitro* anti-AchE aktivitet av salvieekstrakt fra flere studier, gjorde Akhondzadeh et al. en klinisk undersøkelse på salvieekstrakt i behandling av pasienter med AD. Forfatterne undersøkte den kliniske effekten og sikkerheten til etanolekstrakt av salvie ved en dose på 60 dråper per dag, på pasienter med mild til moderat AD, over en periode på 4 måneder. Denne undersøkelsen var dobbeltblind, randomisert og placebo-kontrollert. Pasientene var kvinner og menn mellom 65 og 80 år. Totalt 39 pasienter ble tilfeldig fordelt inn i to grupper: 19 fikk salvieekstrakt, 20 fikk placebo. 30 pasienter fullførte undersøkelsen. I salvieekstrakt- og placebogruppen, var det henholdsvis 4 og 5 pasienter som ikke fullførte undersøkelsen. Resultatet fra undersøkelsen viste at pasienter med mild til moderat AD som fikk salvieekstrakt opplevde statistisk signifikant bedring av kognitive funksjoner etter 4 måneder. Bivirkningene knyttet til salvie var generelt de som er forventet ved stimulering av det kolinerge systemet, og de som er rapportert for AchE-hemmere: kvalme, trøtthet, magesmerter. Derimot var det registrert flere tilfeller for opphisselse hos placebo- enn salvieekstraktgruppen. Forfatterne konkluderte at salvieekstrakt kan være effektiv i behandling av mild til moderat AD, samt at ekstraktet kan redusere opphisselse hos pasienter med AD, men flere undersøkelser er nødvendig for å kunne validere resultatene (Akhondzadeh et al. 2003).

Iuvone et al. studerte effekten til et standardisert ekstrakt av salvieblader og dets aktive forbindelse, rosmarinsyre, på Alzheimer amyloid- β peptid ($A\beta$)-indusert toksisitet i kultureret feokromocytoma (PC12) rotteceller. Inkubasjon av PC12 celler med $A\beta$ (fragment 1-42) i 24 timer førte til celledød, og denne effekten ble redusert av salvieekstrakt og rosmarinsyre. Rosmarinsyre reduserte antall begivenheter indusert av $A\beta$. Disse inkluderer ROS-dannelse, lipidperoksidering (LP), DNA-fragmentering, kaskade-3 aktivering, og tau protein hyperfosforylering. Videre hemmet rosmarinsyre fosforylert p38 mitogenaktivert proteinkinase men ikke glykogensyntasekinase 3β aktivering. Dataene viste den nevroprotektive effekten til salvieekstrakt mot $A\beta$ -indusert toksisitet, og rosmarinsyre kunne delvis bidra til denne effekten (Iuvone et al. 2006).

2) Antioksidantaktivitet:

Frie radikaler er forbundet med utvikling eller forverring av mange sykdommer, fordi overskudd av reaktive oksygenspecies er knyttet til skade på lipider, proteiner og DNA. Hjernen er rik på lipider og er derfor meget utsatt for skader fra frie radikaler. Antioksidanter er derfor antatt for å være viktige i terapeutisk strategi ved sykdommer i CNS, ved å begrense skader forårsaket av frie radikaler (Perry et al. 2000b). Antioksidantaktiviteten til salvie er godt undersøkt. Et vandig etanolekstrakt av salvie har vist dose-avhengig inhibering av lipidperoksidering (Hohman et al. 1999). Metanolekstrakt av salvieblader har også vist antioksidantaktivitet i både enzym-avhengig og enzym-uavhengig lipidperoksidering (Zupkó et al. 2001). En rekke potente antioksidanter i salvie har blitt identifisert: kaffesyre, carnosinsyre, carnosol, rosmarinsyre (Cuvelier et al. 1996; Wang et al. 2000), salvianolsyrene I, K og L og andre fenoliske forbindelser (Wang et al. 1999; Lu og Foo 2001a; Lu og Foo 2001b).

3) Antiinflammatorisk aktivitet:

Inflammasjon er assosiert med uheldige effekter i en rekke sykdommer inkludert AD. Mange studier har sett på den antiinflammatoriske effekten til planter generelt, og visse bestanddeler, hovedsakelig fenoliske, slik som flavonoider, antas å være ansvarlige for aktiviteten. *Salvia*-arter inneholder en rekke antiinflammatoriske bestanddeler inkludert flavonoidene cirsimaritin, genkwanin, luteolin, quercetin og salvigenin, terpenoidene tymol, α - og β -pinen, og rosmarinsyre (Perry et al. 2000b). Heksan- og kloroformekstrakter av salvie har vist dose-avhengig inhibering av krotonoljeindusert øreødem hos mus. Ursolsyre ble isolert og identifisert som den aktive komponenten (Baricevic et al. 2001).

4) Østrogen aktivitet:

Forbindelser med østrogeneffekt har blitt foreslått å spille en viktig rolle i å hindre eller forsinke nevrodegenerering av AD. Det er rapportert at kvinner som bruker hormontilskudd har redusert risiko for utvikling av AD. Det er funnet at kolinerge nevroner i hjernen har østrogenreseptorer. Når østrogen blir gitt til rotter, førte det til økt aktivitet av acetyltransferase, enzymet som danner acetylkolin. Det er rapportert at salvie har østrogeneffekt (Perry et al. 2000b). I Storbritannia selges salviepreparater reseptfritt til behandling av symptomer og plager ved menopause (Kennedy og Scholey 2006).

Andre aktiviteter:

- **Antihyperlipidemi aktivitet**

Det er rapportert at carnosinsyre og carnosol har hemmende aktivitet på lipase fra pankreas (bukspyttkjertelen) med IC₅₀-verdier på henholdsvis 12 µg/ml og 4.4 µg/ml (tabell 33) (Ninomiya et al. 2004).

Tabell 33: Hemmende effekt til carnosinsyre og carnosol på pankreaslipase fra svin.

Forbindelse Konsentrasjon (µg/ml)	Hemming (%)					IC50 (µg/ml)
	1	3	10	30	100	
Carnosinsyre	4	12	36	76	96	12
Carnosol	8	41	76	96	99	4.4

Carnosinsyre har dessuten vist signifikant evne til å redusere serum triglyserid (TG) i olivenolje-belastede mus ved perorale (p.o.) doser på 5-20 mg/kg. Orlistat er et legemiddel mot fedme som spesifikt hemmer gastrointestinale lipaser ved å danne kovalente bindinger til det aktive serinbindingsstedet på gastro- og pankreaslipaser (Anonym 2007). Dette legemidlet ble brukt som referanse. Carnosinsyre viste sammenliknbar aktivitet med orlistat, men carnosol derimot undertrykket ikke TG ved doser på 200 mg/kg *in vivo* (tabell 34). Hos mus som ble føret med høyt fettholdig mat, ble vektøkningen redusert etter 14 dagers behandling med carnosinsyre (20 mg/kg/dag, p.o.). Forfatterne konkluderte at carnosinsyre kan være effektiv i behandling av overvektige pasienter, der årsaken er inntak av mat med høyt fettinnhold (Ninomiya et al. 2004).

Tabell 34: Effekt av carnosinsyre og orlistat på TG økning hos olivenolje-belastet mus.

Behandling	Dose (mg/kg, p.o)	N	2 t	Serum TG (mg/100 ml)	
				4t	6t
Normal (vann)	-	6	169±18	118±11	109±8
Kontroll (olivenolje)	-	6	571±61	454±37	194±18
Carnosinsyre	5	6	316±40	288±34	143±16
	10	6	390±39	239±19	112±16
	20	6	220±25	157±25	85±9
Normal (vann)	-	5	172±16	125±8	97±11
Kontroll (olivenolje)	-	7	543±31	405±37	258±23
Orlistat	5	5	317±89	255±46	145±35
	10	5	237±34	208±14	101±6
	20	5	177±15	157±19	103±7

- **Antiproteaseaktivitet**

Triterpenene β -ursolsyre og β -oleanolsyre ble testet for *in vitro* antiproteaseaktivitet på to neoplastiske proteaser: (cysteinprotease) kathepsin B og (serinprotease) urokinase, som er involvert i tumorinvasjon og metastase. Antiproteaseaktiviteten ble i tillegg testet på serinproteasene trypsin og trombin, fordi det er antatt at triterpenene har en selektiv effekt på urokinase. Quercetin ble brukt som referanse. β -ursolsyre viste sterkest hemmende aktivitet på urokinase (IC_{50} = 12 μ M) og kathepsin B (IC_{50} = 10 μ M) (tabell 35). På dette grunnlaget ble β -ursolsyre videre testet for evnen til å inhibere *in vivo* lungekolonisering av B16 melanomceller på mus. Mus ble injisert i.p. (intraperitoneal: innenfor bukhinnen) med β -ursolsyre i doser på 50, 75 og 100 mg/kg. Resultatet viste at β -ursolsyre ved en dose på 50 mg/kg reduserte antallet B16 kolonier i lungene til musene signifikant (Jedinák et al. 2006).

Tabell 35: Antiproteaseaktivitet til triterpener uttrykt som IC_{50} (μ M).

Triterpener	Trypsin IC_{50} (μ M)	Trombin IC_{50} (μ M)	Urokinase IC_{50} (μ M)	Kathepsin B IC_{50} (μ M)
β -ursolsyre	0.010	0.030	0.012	0.010
β -oleanolsyre	0.020	0.050	0.070	0.090
Quercetin	0.015	0.026	0.014	0.011

- **Hepatoprotektiv aktivitet**

Amin og Hamza rapporterte at mus som ble behandlet med vannekstrakt av salvie i 5 uker ble beskyttet mot hepatotoksisitet av azathioprin, en antimetabolitt som blant annet fører til hepatotoksisitet ved å redusere GSH (redusert form av glutathion)-nivå. (Amin og Hamza 2005).

Lima et al. rapporterte at vannekstrakt (te) av den overjordiske delen til salvie gitt til mus og rotter i stedet for vann i 14 dager økte aktiviteten til GST (glutathion-S-transferase) i mus- og rottelever med henholdsvis 24 og 10 %. Vannekstraktet ble analysert for fenoliske forbindelser ved hjelp av HPLC/DAD (diode array-detektor). Rosmarinsyre og fire luteolinglykosider ble identifisert. Luteolin-7-glykosid ble funnet som hovedflavonet. De flyktige komponentene i vannekstraktet ble identifisert ved hjelp av GC og GC-MS. Det ble identifisert 25 flyktige komponenter med 1,8-cineol, *cis*- og *trans*-thujon, kamfer og borneol som hovedkomponent. Videre ble antioksidantpotensialet ved drikking av salviete studert *in vitro* ved bruk av rottehepatocytter i primærkultur. Resultatet viste en forbedring i antioksidant status hos rottehepatocytterne, med signifikant økning i GSH (redusert form av glutathion) innhold og GST aktivitet etter 4 timer. Når disse hepatocyttkulturene ble utsatt for 0.75 eller 1 mM *tert*-butyl hydroperoksid (*t*-BHP) i 1 time, ble det observert noe beskyttelse mot lipidperoksidering og GSH forbruk. Forfatterne konkluderte at vannekstrakt av salvie inntatt i form av te kan påvirke antioksidant statusen i leveren på en positiv måte og kan ha hepatoprotektiv potensiale (Lima et al. 2005).

På grunnlag av studien nevnt ovenfor (Lima et al. 2005), studerte forfatterne den beskyttende effekten til salviedrikking i 14 dager hos mus av begge kjønn mot hepatotoksisitet knyttet til fri radikal dannelse forårsaket av karbontetraklorid (CCl₄). I motsetning til det som var forventet, førte drikking av salviete til signifikant økning av CCl₄-indusert leverskade, observert ved økt plasma transaminase-nivå og ved mikroskopi av levervev. I samsvar med tidligere studie (Lima et al. 2005), førte drikking av salviete til økt aktivitet av GST. I tillegg ble også glutathionperoksidase økt signifikant ved drikking av salviete. Bioaktivering av CCl₄, som fører til hepatotoksisitet, er hovedsakelig knyttet til cytokrom P450 (CYP) 2E1. Ekspresjon av CYP 2E1 ble målt med Western Blot. Det ble observert en økning i CYP 2E1, hvilket kunne være en del av forklaringen til potensiering av CCl₄-indusert hepatotoksisitet knyttet til drikking av salviete. Det ble observert CCl₄-indusert hepatotoksisitet i større grad hos hunn- enn hannmus. Forfatterne konkluderte at selv om salviete i seg selv ikke fører til hepatotoksisitet, kan interaksjoner mellom salviete og legemidler metabolisert av fase 1- enzymer påvirke virkningen og sikkerheten (Lima et al. 2007a).

Lima et al. studerte den cytoprotektive effekten til vann- og metanolekstrakt av den overjordiske delen til salvie på *tert*-butyl hydroperoksid (*t*-BHP) indusert toksisitet i HepG2 celler (hepatocellulær carcinom celledinje). Ekstraktene ble analysert for fenoliske forbindelser. Metanolekstraktet hadde høyest fenolisk innhold med rosmarinsyre som hovedkomponent, mens det i vannekstraktet var rosmarinsyre og luteolin-7-glukosid. Radikalscavenging aktiviteten til begge ekstraktene ble testet mot DPPH og superoksidradikal. Quercetin, et flavonoid,

ble brukt som referanse. Metanolekstraktet ($IC_{50}=13.5 \mu\text{g/ml}$) viste litt høyere aktivitet enn vannekstraktet ($IC_{50}\text{-verdi}=14.9 \mu\text{g/ml}$) på DPPH-scavenging (tabell 36). Vannekstraktet viste derimot betydelig høyere aktivitet enn metanolekstrakter på superoksidradikalscavenging, med $IC_{50}\text{-verdi}$ på henholdsvis 14.4 og 162 $\mu\text{g/ml}$. Quercetin viste høyere aktivitet enn begge ekstraktene i både DPPH- og superoksidradikalscavenging (Lima et al. 2007b).

Tabell 36: Radikalscavenging aktivitet til salvieekstrakter og quercetin.

Ekstrakt/forbindelse	DPPH IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Superoksidradikal IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Metanolekstrakt av salvie	13.5 ± 0.5	162 ± 39
Vannekstrakt av salvie	14.9 ± 0.3	14.4 ± 1.4
Quercetin	3.43 ± 0.07	10.6 ± 1.0

Den cytoprotektive effekten til begge ekstraktene ble testet på celledød induisert av *t*-BHP (2mM) på HepG2 celler. Resultatet viste at begge ekstraktenes beskyttende effekt mot celledød var dose-avhengig. Metanolekstraktet viste høyere aktivitet enn vannekstraktet, og hadde sammenliknbar aktivitet med quercetin (tabell 37) (Lima et al. 2007b).

Tabell 37: Cytoprotektiv aktivitet hos salvieekstrakter og quercetin mot *t*-BHP induisert celledød på HepG2 celler.

Ekstrakt/ forbindelse	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{80} ($\mu\text{g/ml}$)
Metanolekstrakt av salvie	7.6 ± 0.5	16
Vannekstrakt av salvie	101.4 ± 11.3	~250
Quercetin	6.5 ± 0.5	13

Salvieekstraktene og quercetin ved IC_{80} -konsentrasjon i dette assayet ble videre testet for beskyttende effekt på *t*-BHP (2mM) induisert lipidperoksidering, GSH (glutation redusert form) forbruk, og DNA ødeleggelse i HepG2 celler. Resultatet viste at begge ekstraktene og quercetin hindret omtrent 80 % celledød induisert av *t*-BHP. Begge ekstraktene reduserte omtrent 25 % lipidperoksidering induisert av *t*-BHP. Quercetin beskyttet mot lipiperoksidering med 30 %. GSH forbruk induisert av *t*-BHP ble signifikant hemmet av begge ekstraktene med omtrent 62 %, men quercetin hemmet 40 %. *t*-BHP induert DNA ødeleggelse på HepG2 celler ble hemmet av quercetin med omtrent 50 %. Ekstraktene derimot beskyttet ikke mot DNA ødeleggelse (Lima et al. 2007b).

- **Antimutagen aktivitet**

Vuković-Gaćić et al. studerte mutagent og anti-mutagent potensiale til den eteriske oljen til salvie og dets monoterpener, thujon, 1,8-cineol, kamfer, og limonen, mot UVC-induserte mutasjoner på *Salmonella*/mikrosom, *E. coli* WP2, *E. coli* K12 og *S. cerevisiae* D7 reverseringstest. Mutagent potensiale til den

eteriske oljen og monoterpenene ble verken observert hos bakteriestammene eller *S. cerevisiae* D7. Den eteriske oljen ga antimutagen respons i alle bakteriestammer hvor mutasjoner ble fremkalt med UV-stråling. Graden av inhibering på mutagenese var mellom 50 og 70 % i alle bakteriestammene ved maksimum ikke-toksisk konsentrasjon. α - og β -Thujon viste en dose-avhengig inhibering av mutagenese og nådde 50 % ved en konsentrasjon på 15 μ l/plate. Limonen viste ikke antimutagen aktivitet. 1,8-cineol viste liknende antimutagen potensiale som α - og β -thujon opptil en konsentrasjon på 10 μ l/plate. Kamfer viste antimutagen aktivitet ved veldig lave konsentrasjoner (omtrent 40 % ved 0.5 og 1 μ g/plate), med ingen videre økning av aktivitet opptil 10 μ g/plate. *S. cerevisiae* D7 ble anvendt for å teste antimutagen potensialet til monoterpener på eukaryote celler. Monoterpene viste antimutagen aktivitet hos *S. cerevisiae* D7 ved en høyere konsentrasjon enn hos bakteriestammene. Ti mikroliter per plate av α - og β -thujon, 1,8-cineol og limonen var nødvendig for å produsere antimutagen effekt i D7. Den eteriske oljen hadde ingen effekt opptil 20 μ l/plate og viste 60 % reduksjon av mutagenese ved 60 μ l/plate. Kamfer produserte antimutagen aktivitet hos D7 ved lave konsentrasjoner. Forfatterne konkluderte at de testede monoterpene kan være medvirkende årsak til den antimutagene aktiviteten til den eteriske oljen til salvie, men medvirkning av andre komponenter som ikke ble testet i denne studien kan ikke utelukkes. Den beskyttende effekten til den eteriske olje til salvie og dets monoterpener mot UV-indusert mutasjoner viser at salvie kan være relevant i kjemoprevensjon (Vukovic-Gacic et al. 2006).

- **Hypoglykemisk aktivitet**

Salvie er rapportert å vise sterke hypoglykemiske egenskaper basert på etnofarmakologiske data og farmakologiske studier. Den eteriske oljen til salvie ble testet på normale rotter eller diabetiske rotter indusert av alloksan, viste hypoglykemiske effekter (Baricevic og Bartol 2000).

Vandig etanolekstrakt av hele salvieplanten (500 mg/kg) administrert intraperitonealt (i.p) på normale og alloksan-induserte diabetiske rotter har vist hypoglykemisk aktivitet. Ekstraktet produserte en reduksjon av det basale blodglukosenivået etter 120 og 240 minutter hos friske fastende rotter. Denne effekten var sammenliknbar med den til tolbutamid (60 mg/kg), et antidiabetisk legemiddel som ble brukt som referanse (tabell 38). Effekten til ekstraktet var derimot lavere enn tolbutamid hos fastende diabetiske rotter indusert av alloksan (tabell 39). Hos alvorlig diabetiske rotter viste verken tolbutamid eller ekstraktet hypoglykemisk effekt. Dette kan tyde på at insulin i organismene virker indirekte på den hypoglykemiske effekten hos salvieekstraktet, og hos tolbutamid og sulfonylureapreparater generelt. Resultatet fra denne studien

indikerer at vandig etanolekstrakt av salvie inneholder polare hypoglykemiske forbindelser, fordi ekstraktet var lettløselig i vann (Alarcon-Aguilar et al. 2002).

Tabell 38: Effekten til vandig etanolekstrakt av salvie på blodglukosenivået til fastende friske rotter.

Studie	n	Dose mg/kg	Blodglukose mg/dl		
			Fastende	120 min	240 min
Kontroll	18	-	54.4±1.7	54.3±2.1	56.1±2.9
Tolbutamid	6	60	57.2±3.7	39.6±3.8	45.7±3.9
Salvieekstrakt	10	500	55.9±3.1	47.1±2.4	39.0±3.1

Tabell 39: Effekten til vandig etanolekstrakt av salvie på blodglukosenivået til fastende alloxan-induserte diabetiske rotter.

Studie	n	Dose mg/kg	Blodglukose mg/dl		
			Fastende	120 min	240 min
Kontroll	6	-	266.2±8.2	273.8±7.9	272.3±22.7
Tolbutamid	6	60	284.5±16.8	164.3±18.5	173.7±19.1
Salvieekstrakt	6	500	284.2±25.1	252.2±27.4	219.8±27.9

Eidi et al. (2005) rapporterte at metanolekstrakt av salvieblader (100, 250, 400 og 500 mg/kg) administrert intraperitonealt på streptozotocin-induserte diabetiske rotter viste hypoglykemisk effekt. Metanolekstraktet produserte en statistisk signifikant reduksjon i blodglukosekonsentrasjon hos diabetiske fastende rotter i 3 timer uten å påvirke insulinfrigjøring fra pankreas. Det ble derimot ikke vist effekt på friske rotter. Den eteriske oljen til salvie ble også testet, men viste ikke hypoglykemisk effekt (Eidi et al. 2005).

Rau et al. (2006) rapporterte at etanolekstrakt av salvie viste hypoglykemisk effekt knyttet til aktivering av PPAR γ (peroksisom proliferator-aktivert reseptor gamma). PPAR γ er en ligand-aktivert transkripsjonsfaktor, som tilhører metazoa-familien av hormonreseptorer i cellekjernen. Aktivering av PPAR γ øker transkripsjonen til enzymer involvert i primærmetabolisme, som fører til redusert fettsyre- og glukosenivåer i blodet. Det ble funnet at carnosinsyre og carnosol var ansvarlige for denne effekten, men at andre forbindelser som er knyttet til eller derivater av carnosol også kan være involvert. Carnosinsyre og carnosol var selektive aktivatorer på PPAR γ med forholdsvis EC₅₀-verdier på 19.6 ± 2.0 μ M og 41.2 ± 5.9 μ M (Rau et al. 2006).

- **Kardiovaskulære aktiviteter**

Dyrestudier har vist at salvie har evnen til å redusere blodtrykket. Vann-alkohol-ekstrakten til salvie applisert enten intravenøst eller duodenalt på katter induserte en moderat men langvarig reduksjon av blodtrykket (Todorov et al. 1984; Newall et al. 1996, referert av Baricevic og Bartol 2000).

- **Antispasme aktivitet**

Det er rapportert at salvieekstrakter har antispasme effekt i *in vitro* studier. Mekanismen for denne effekten er inhibering av glattmuskulaturkontraksjon induisert av acetylkolin, histamin, serotonin og bariumklorid ved 60 til 80 % (Todorov et al. 1984) refert av (Baricevic og Bartol 2000).

- **Angstløsende og sedative aktiviteter**

Diterpenoidene carnosinsyre og carnosol har i tillegg til antioksidant effekt også en hemmende effekt på GABA_A (gamma aminosmørsyre type A)-reseptorer ved inhibering av ligandbinding til kloridkanaler på reseptoren, hvilket virker angstløsende (Baricevic og Bartol 2000). Monoterpenet linalool som finnes i den eteriske oljen virker hemmende på glutamatbinding, hindrer utløsning av stimulerende signaler i hjernen, har derfor antikonvulsant effekt (Puleo 1978; Elisabetsky et al. 1995) refert av (Baricevic og Bartol 2000).

Kavvadias et al. rapporterte at dietyleter- og n-heksanfraksjon av metanolekstrakt av salvieblader viste høy affinitet til human benzodiazepinreseptor *in vitro*. Identifisering av de isolerte forbindelsene fra begge fraksjonene ga 5 forbindelser: apigenin, hispidulin, cirsimaritin, 7-metoksyrosmanol og galdosol. Forbindelsene viste konkurrerende inhibering av ³H-flumazenil binding til benzodiazepinreseptor med IC₅₀-verdier på henholdsvis 30, 1.3, 350, 7.2 og 0.8 µM for apigenin, hispidulin, cirsimaritin, 7-metoksyrosmanol og galdosol (tabell 40). Galdosol viste sterkest affinitet til benzodiazepinreseptor (Kavvadias et al. 2003). Flumazenil er en benzodiazepinantagonist, som virker hypnosedativt ved å blokkere virkningene til substanser som virker via benzodiazepinreseptoren ved konkurrerende interaksjon. Diazepam, et benzodiazepinderivat som virker angstløsende og krampeføsende (Anonym 2007), ble brukt som referanse. Forfatterne konkluderte at de identifiserte forbindelsene fra denne studien kan interagere spesifikt med sentralnervesystemet, men at fremtidige studier er nødvendig for å evaluere *in vivo* relevans og biotilgjengelighet (Kavvadias et al. 2003).

Tabell 40: IC₅₀-verdi til forbindelser isolert fra salvie og diazepam (referanse) målt ved ikke-lineær regresjon analyse av bindingsdata.

Forbindelse	IC ₅₀ (µM)
Apigenin	30 ± 4
Hispidulin	1.3 ± 0.2
Cirsimaritin	350 ± 37
7-metoksyrosmanol	7.2 ± 0.7
Galdosol	0.8 ± 0.1
Diazepam	0.05 ± 0.01

- **Immunomodulerende aktivitet**

Komplementsystemet er betegnelsen på en samling proteinmolekyler (C1-C9) som blant annet finnes i blodplasma, og som virker på hverandre gjennom en kaskadereaksjon. Stort sett er komplementkomponentene inaktive hos et friskt individ, men de kan bli aktivert av bakterier og virus gjennom *alternativ aktivering*, eller av antistoffer som har blitt dannet mot den aktuelle mikroorganismen på forhånd, gjennom *klassisk aktiveringsvei*. Klassisk komplementaktivering som ikke involverer antistoffer har også blitt beskrevet: Akuttfasereaktanten mannosebindende lektin kan binde seg til overflaten på mange mikroorganismer. Dette fører til aktivering av en serin protease (MASP: Mannosebindende lektin Serin Protease). MASP virker på et tidlig trinn i klassisk aktiveringsvei, hvilket representerer en tredje måte å aktivere komplementsystemet på. Disse tre aktiveringsveiene vil falle sammen i et fellestrinn i kaskaden og føre til dannelsen av det terminale komplementkompleks (TCC) som har evne til å ødelegge fosfolipidmembraner og lysere celler (Lea 2002).

Aktivering av komplementsystemet fører til ødeleggelse av biologiske membraner, d.v.s. drepe bakterier og celler, men aktiveringsproduktene har også en rekke biologiske effekter, og noen påvirker den spesifikke delen av immunresponsen. Komplementfragmenter som dannes under aktiveringsprosessen kan aktivere mastceller og basofile granulocytter til frigjøring av stoffer som stimulerer til, og bidrar i, betennelsesprosessen, kalles anafylatoksiner (C3a og C5a). Komplementaktivering fører altså til inflammatoriske responser i tillegg til immunologisk forsvarsreaksjoner. Komplementfragmentene kan videre bli degradert til andre fragmenter (iC3b, C3b, C3g, C3dg etc.) på grunn av effekten til komplementregulatorer før og etter binding til komplementreseptorer på makrofager og T- og B-lymfocytter. Disse primære eller sekundære komplementfragmentene er altså kjent for å aktivere eller undertrykke funksjonene til makrofager, og T- og B-celler (Lea 2002).

Mange ulike typer av polysakkarider isolert fra planter som ble brukt i folkemedisinen har blitt identifisert for sin aktivitet på komplementsystemet; for eksempel arabinogalaktaner og rhamnogalakturonaner (Paulsen og Barsett 2005). Salvie har siden oldtiden vært en viktig medisinsplante som ble brukt til å kurere mange sykdommer, derfor var det ansett mulig at salvie kan inneholde biologisk aktive polysakkarider som virker på komplementsystemet. Vitenskapelige undersøkelser på immunomodulerende egenskaper til polysakkarider i salvie har vist positive resultater:

Den overjordiske delen til salvie ble ekstrahert med metanol-kloroform og deretter ekstrahert i følgende rekkefølge: vann, vandig ammoniumoksalat, dimetyl sulfoksid (DMSO) og vandig kaliumhydroksid (KOH). Delvis rensing av vannekstraktet ga fraksjon A. Fraksjon A bestod av arabinogalaktaner bundet til de høyt forgrenete rhamnogalakturonankjernene. Fraksjon B, ekstrahert med oksalat, bestod av arabinanrik pektinkomponent. Fraksjon D, ekstrahert med KOH, bestod av xylanrike polysakkarider. Identifikasjon av komponentene var basert på monosakkaridsammensetning, IR, og NMR. Alle disse tre fraksjonene viste immunostimulerende kapasitet som ble demonstrert i lymfocyt transformasjonstest. Fraksjonene viste en direkte mitogen aktivitet i rottethymocytter i følgende rekkefølge: $D > B > A$. Dessuten viste fraksjon D en signifikant comitogen effekt. Resultatet tyder på at arabinogalaktaner bundet til høyt forgrenete rhamnogalaktankjerner (fraksjon A) og arabinanrik pektinkomponent (fraksjon B) bidrar av forskjellige grad til den immunomodulerende aktiviteten til salviepolysakkarider. Xylanrike polysakkarider i salvie (fraksjon D) viste også signifikant mitogen og comitogen aktivitet (Capek et al. 2003).

I et annet arbeid ekstraherte Capek og Hribalova den overjordiske delen til salvie med metanol-kloroform og deretter med vann. Et polysakkarid kompleks (A) ble oppnådd ved felling av vannekstraktet med etanol. Dette komplekset ble videre kromografert over DEAE-Sephacel og delt inn i seks fraksjoner ved trinnvis eluering med vann (A1), natriumkloridløsninger av økende konsentrasjoner (A1-A5) og natriumhydroksidløsning (A6). Det ble funnet uronsyre i alle fraksjonene, deres innhold varierte fra 4.7 til 23.8 %. Immunomodulerende aktiviteten til polysakkarid kompleks A og dets fraksjoner A1-A6 ble undersøkt i in vitro comitogen thymocyttest. Det vannløselige polysakkaridkomplekset og fraksjonene induserte proliferasjon av rotte thymocytter i følgende rekkefølge $A2 > A3 = A4 > A1 = A5 = A6 > A$. Dessuten viste fraksjon A2, A3 og A4 en signifikant comitogen effekt. Ved separasjon av det vannløselige polysakkaridkomplekset A etter uronsyreinnhold og molekylmasse ga fraksjonene A1-A6 signifikant øket immunomodulerende aktivitet sammenliknet med polysakkaridkomplekset. Analyse av sammensetningen og metyleringen, samt ^{13}C -NMR, indikerte arabino-3,6-galaktan som hovedkomponent i A1-, arabinogalaktaner bundet til rhamnogalakturonankjeder i A2-, A3-, og A4-, og heksantype polysakkarider i A5- og A6- fraksjoner. De sure fraksjonene A2-A4 hadde høyere immunomodulerende aktivitet enn fraksjon D, som tidligere var beskrevet som det mest potente polysakkaridet isolert fra salvie (Capek et al. 2003). Resultatet tyder på at forgrenet rhamnogalakturonan-I kjerne med arabinan eller arabinogalaktanrik sidekjeder (A2-A4) og glukuronoxylanrelaterte polymere (D) er de mest potente polysakkaridenekomponentene i salvie. Fraksjon A2 hadde dessuten det høyeste innholdet av 3-O-metylgalaktose enhet, hvilket kan være

en viktig strukturell faktor for dens immunomodulerende aktivitet (Capek og Hribalova 2004).

Ebringerova et al. studerte mitogen og comitogen aktiviteten til polysakkarider fra noen europeiske planter, deriblant salvie. Den overjordiske delen til salvie ble ekstrahert med vann og videre rensset og fraksjonert. Det ble oppnådd to vannløselige fraksjoner SaP1 og SaP2. HPGPC (høytrykks gelpermeabilitets kromatografi), NMR-spektroskopi og metyleringsanalyse av SaP1 og SaP2 viste tilstedeværelse av et kompleks av polysakkarider som inneholder pektisk arabino- (1→ 3,6)-galaktaner, (1→ 3,5)-arabinan, stivseliknende α -glukaner og xylaner. Den immunomodulerende aktiviteten til SaP1 og SaP2 ble undersøkt. Mitogen og comitogen *in vitro* thymocyttest ble anvendt, og zymosan, en kommersielt tilgjengelig immunomodulator, ble brukt som kontroll. Testen viste at polysakkaridene ga biologisk respons som var dose-avhengig og nådde et maksimum ved en dose på 100 $\mu\text{g/ml}$. SaP1 og SaP2 viste bedre aktivitet enn zymosan. Forfatterne konkluderte med at polysakkaridene i salvie viste signifikant immunomodulerende aktivitet med en spesiell høy adjuvansaktivitet som overgikk den til zymosan (Ebringerova et al. 2003).

Toksisitet

Inhalasjon av flyktige salviekomponenter eller peroralt inntak av salvie og dens kommersielle preparater er vist å kunne fremkalle kramper (konvulsjoner) som stammer fra sentralnervesystemet. Denne effekten har vært kjent i mer enn hundre år. Toksisiteten til salvie er forårsaket av dens eteriske olje med et høyt innhold av ketoniske terpenoider: thujon og kamfer (Baricevic og Bartol 2000). α -thujon er en giftig forbindelse i absint, en popoulær likør på 1800- og tidlig på 1900-tallet blant kunstnere og forfattere, inkludert Vincent van Gogh. Absint induerte hallusinasjoner og av og til bidro til psykoser og selvmord. Hold et al. rapporterte at α -thujon i høye doser fremkalte konvulsjoner og deretter død hos mus. Forfatterne undersøkte mekanismen til α -thujons nevrotoksisitet, og fant at α -thujon virker på det non-kompetitive blokkerende setet til GABA_A-reseptorer (Hold et al. 2000). Kamfer i små doser er rapportert å være meget giftig og kan føre til fatale konsekvenser hos barn under 6 år. Forbindelsen er veldig lipofil på grunn av den sykliske strukturen. Den absorberes meget raskt gjennom slimhinner og distribusjonsvolumet er stort. Kamfer kan være dødelig i doser mellom 50 og 150 mg/kg. Symptomene begynner vanligvis 5-90 minutter etter peroralt inntak. Ved mild forgiftning oppstår gastrointestinale symptomer som kvalme og oppkast. Alvorlig forgiftning fører til symptomer i sentralnervesystemet som forvirring, hallusinasjoner, tonisk muskulær kontraksjon, koma og respirasjonsstans. Peroralt inntak av mer enn ganske små mengde kamfer bør derfor unngås (Emery og Corban 1999; Love et al. 2004).

Interaksjoner med andre legemidler

Salvie kan interferere med eksisterende hypoglykemisk og antikonvulsant terapi og kan forsterke effekten til sedativa (Newall et al. 1996) refert av (Baricevic og Bartol 2000).

Gravide og ammende

Salvie bør ikke brukes ved graviditet. Thujon i den eteriske oljen stimulerer musklene i uterus, hvilket er rapportert å føre til abort hos gravide. Salvie bør ikke brukes av ammende mødre, da den virker hemmende på melkeutskillelsen (Baricevic og Bartol 2000).

Produksjon av fenoliske antioksidanter fra *in vitro* skudd av salvie.

Santos-Gomes et al. studerte produksjonen av fenoliske antioksidanter fra *in vitro* skudd av salvie under forskjellige hormonelle tilsetninger: MS basal medium tilsatt 20 g/l sukrose, 0.05 mg/l 2,4-diklorofenoksyeddisyre (2,4-D) kombinert med 1.5 mg/l benzyladenin (BA) eller med kinetin (KIN) ved konsentrasjoner på 1.5, 2.0 eller 4.0 mg/l. I alt ble det testet på fire hormonelle tilsetninger. Prøvene og tre forskjellige kommersielt tilgjengelige prøver av salvie ble ekstrahert med aceton. Analyse av prøvene i HPLC/diode array-detektor viste at de kommersielt tilgjengelige prøvene av salvie inneholdt 15 ulike forbindelser, mens *in vitro* skudd av salvie inneholdt 17 ulike forbindelser. Carnosinsyre og metylcarnosat ble ikke funnet i de kommersielt tilgjengelige prøvene, men derimot i *in vitro* skudd av salvie. Det var tydelige forskjeller på mengden av forbindelser isolert fra *in vitro* skudd og kommersielle prøver av salvie. Rosmarinsyre, rosmadial og kaffesyre ble funnet i større mengder fra *in vitro* skudd av salvie enn kommersielle prøver av salvie. Høyest akkumulering av totalt fenolisk innhold, særlig rosmarinsyre og carnosol, ble funnet hos *in vitro* skudd med tilsetning av 1.5 mg/ml KIN. Forfatterne konkluderte med at sammensetningen av medium, tilsetning av vekstfaktorer, og miljøfaktorer, som temperatur, lys og atmosfærisk sammensetning, kan lett kontrolleres i *in vitro* systemer. Produksjon av fenoliske antioksidanter fra *in vitro* skudd av salvie kan derfor være et godt alternativ (Santos-Gomes et al. 2002).

Faktorer som påvirker den kjemiske sammensetningen til salvie: variasjoner i individer, plantedeler, årstider og steder

Perry et al. rapporterte at oljeutbyttet fra pilot-skala destillasjoner om sommeren var signifikant høyere fra ikke-blomstrende planter enn fra blomstrende planter. Blomstrende planter har høyere nivåer av thujoner, β -karyofyllen og viridiflorol enn ikke-blomstrende planter (Perry et al. 1996).

Perry et al. studerte den kjemiske sammensetningen til salvie med hensyn til variasjoner blant individer, plantedeler, årstider, og steder. Det ble funnet forskjellige nivåer av α - og β -thujon, 1,8 cineol, og kamfer hos ni individuelle salvieplanter (åtte blomstrende planter, en ikke-blomstrende plante). Hos ikke-blomstrende planter var totalt oljeutbytte litt høyere enn hos blomstrende planter, men innholdet av α - og β -thujon var mye lavere hos ikke-blomstrende enn hos blomstrende planter. Hos blomstrende planter var det forskjeller i forholdet mellom α - og β -thujon. Disse kunne derfor deles inn i tre kvalitative thujon-kjemotyper, basert på deres α/β thujonforhold: $\sim 10:1$ α/β , $\sim 1.5:1$ α/β og $1:10$ α/β (Perry et al. 1999).

Videre ble det funnet forskjeller i oljeinnhold hos plantedeler. Blomstrene hadde det høyeste oljeinnholdet, etterfulgt av bladene. Stengelene derimot hadde et svært lavt oljeinnhold. Blomsteroljen hadde høyest innhold av β -pinene, mens bladoljen var høyest på thujoner (hovedsakelig α -thujon) (Perry et al. 1999).

Variasjoner knyttet til årstider og steder ble undersøkt hos blomstrende planter av kjemotypen med høyt totalt thujoninnhold og høyt α -thujoninnhold. Disse ble plantet i to forskjellige steder i New Zealand: Redbank og Invermay. Hovedforskjellen i klima mellom stedene var i sommertemperaturene, med varmere innland (Redbank) enn ved kysten (Invermay). Resultatene viste at miljøfaktorer påvirker indirekte på oljeutbyttet og den kjemiske sammensetningen (Perry et al. 1999).

Årstidsvariasjonen var knyttet til blomstring. I løpet av blomstringen falt det gjennomsnittlige thujon-nivået drastisk fra over 40 % til et minimum på ~25 % begge steder. Kamfer-nivået ble også redusert i løpet av blomstringen. Derimot var nivået til β -pinen og 1,8 cineol på sitt høyeste ved blomstring. Også borneol-nivået økte ved blomstring, men var på sitt høyeste etter blomstring. En høyere andel unge blader om våren, viste et lavere innhold av thujoner, kamfer og 1,8-cineol. Oljeutbyttet hos friske, etablerte planter var avhengig av mengden av blader og/eller blomster høstet og varierte ikke stort med årstid. For å oppnå salvieolje med høye thujon-nivåer (>45 %), bør friske vegetative planter bli høstet om høsten eller vinteren. Hvis toksisiteten til thujoner er et problem, bør lave thujon-tilvekster bli dyrket og høstet om våren eller i løpet av blomstring (Perry et al. 1999).

Det er funnet en klar sammenheng mellom salviens vekstforhold og dens kjemiske sammensetning. Både urte- og oljeutbyttet blir redusert når salvie dyrkes i et kaldt og skyggefullt miljø. Oljekonsentrasjonen er generelt sett høyere i varme og tørre regioner. Den totale konsentrasjonen til eteriske oljer er høyest i planter dyrket ved 45 % av full sollys. Ved dette lysnivået har oljen et høyere innhold av (+)-thujon og mindre mengder av kamfer, sammenliknet med eterisk olje fra salvie dyrket ved andre lysnivåer (Giannouli og Kintzios 2000).

Salvie er følsom for tørke ved dyrking under feltbetingelser i Middelhavsområdet. Det er funnet at carnosinsyremengden i bladene reduseres, mens nivået av dets oksidasjonsprodukter, rosmanol og isorosmanol, øker (Munne-Bosch et al. 2001).

Santos-Gomes og Fernandes-Ferreira studerte faktorer som påvirker den kjemiske sammensetningen til salvie. Dyrking av salvie ble startet ved såing i veksthus (20-30 °C) i februar 1997. I begynnelsen av april ble plantene overført

til jord i eksperimentelle felt på Arcos de Valdevez og Arouca i Portugal. Den overjordiske delen fra 8-12 salvieplanter ble samlet inn tilfeldig fra begge stedene i juli, oktober og desember i 1998, og i februar, april og juli i 1999. Resultet fra studien viste at sammensetningen til den eteriske oljen til salvie varierte etter årstid og plantedeler. Fra desember til april, ble α -thujon redusert fra 55 % til 12 % (i Arcos de Valdevez) og 46% til 18 % (i Arouca) av den eteriske oljen. Fra samme tidspunktet økte borneol fra 0.73 % til 13.37 % og 1.98 % til 4.21 %. I Arcos de Valdevez var kamfer på sitt høyeste i oktober (22.86 %) og laveste i desember (4.69 %), mens det i Arouca var på sitt høyeste i juli (23.14 %) og laveste i april (2.70 %). Sammensetningen til den eteriske oljen til salvie fra bladene, stenglene og blomstene ble kvantifisert. Dette var planter dyrket i Arouca som ble høstet inn i juli. Resultatet viste at α -thujon var hovedkomponenten i den eteriske oljen med henholdsvis 25.5, 55.1, og 17,7 % fra blader, stengler og blomster. Kamfer representerte 19.5 % i bladene, 5.6 % i stenglene og 3.4 % i blomstene. I blomstene forelå 1,8-cineol (17.3 %) og β -pinen (17.0 %) på lik linje med α -thujon (Santos-Gomes og Fernandes-Ferreira 2001).

Dragland et al. rapporterte at totalt antioksidant innhold i salvie variererte etter salviesort og tid for innhøsting. Salviesortene Richters (Ontario, Canada), Extrakta fra Chrestensen (Erfurt, Tyskland), og Nr 934 fra Johnny's (Winslow, Maine) inneholdt forholdsvis 102, 89 og 83 mmol total antioksidanter/ 100 g. Innhøsting av salvieplantene om sommeren, ga et lavere totalt antioksidant innhold enn innhøsting om høsten, med henholdsvis 96 mmol/ 100 g og 98 mmol/ 100 g for sorten Extrakta fra Chrestensen (Erfurt, Tyskland), og 99 mmol/ 100 g og 104 mmol/ 100 g for Extrakta fra Richters (Ontario, Canada). Metoden FRAP (ferric reducing ability of plasma) ble anvendt til å kvantifisere både vann- og fett-løselige antioksidanter. Salvieplanten ble dyrket fra frø, og transplantert fra et veksthus til et felt på Kise i Sør- Norge (Dragland et al. 2003)

Tradisjonell bruk av *S. officinalis*

Mot overdreven svetting og feber

Tørkede eller friske blader av salvie ble brukt til å lage te som skulle drikkes i små doser hver dag, for å kontrollere overdreven svetting. Effekten starter allerede 2 timer etter inntak. En mulig mekanisme for dette er ved å undertrykke feberkontrollsenteret i hjernen, samtidig med at den glattemuskulaturen slapper av (Dweck 2000). Naturlegemidlet "Nosweat" inneholder salvieblad ekstrakt, og er godkjent av Statens legemiddelverk til bruk ved forbigående, overdreven svetting (Anonym 2006).

For å stanse melkeutskillelse

Salvie har blitt brukt til å stanse melkeutskillelse hos ammende mødre som ønsket å avvenne spedbarnet (Dweck 2000).

Mot dårlig fordøyelse

Salvie ble anvendt som tarmgassdempende middel og som krampeløsende middel ved dårlig fordøyelse og magesmerter (Dweck 2000).

Oral bruk

På grunn av den antibakterielle og den astringerende effekten til salvie, har den blitt anvendt som gurglevann eller munnvask ved inflammasjon i munnen, tunga og halsen (Dweck 2000).

Hudpleie

En infusjon eller kompress av salvie ble anvendt mot store porer i ansiktet. Salviekrem brukes mot forkjølelsessår nær munnen. Salvie blir også brukt i bad for å behandle hudproblemer, på grunn av den antifungale effekten (Dweck 2000).

Sårbehandling

Den sårhelende effekten til salvie er primært knyttet til innholdet av tanniner som virker astringerende og anti-inflammatorisk. Den har blitt anvendt som en lotion eller kompress på sår (Dweck 2000).

Åreknuter og leggproblemer

Bruken av salvie har blitt anbefalt for åreknuter og mot vorter på leggene (Dweck 2000).

Hårpleie

En infusjon av friske salvieblader eller topper har blitt anvendt til å farge håret og for å gjøre håret glansfullt (Dweck 2000).

Mot insekter

Oljen er brukt i insektsdrepende preparater. Den flyktige oljen er kjent for å kunne skremme bort insekter; det var færre insekter i områder hvor salvie ble plantet (Dweck 2000).

Mot nervøsitet

Salvie har også blitt anvendt ved nervøsitet, skjelving, depresjon og svimmelhet (Dweck 2000).

Mentalitet

Salvie har blitt anvendt til å bedre hukommelsen hos eldre og som styrkemiddel for hjernen (Dweck 2000).

Fotpleie

For såre og anstrengte ankler og føtter, ble det anvendt salvielotion i fotbad (Dweck 2000).

Konklusjon

Basert på vitenskapelige undersøkelser er det vist at salvie, *S. officinalis*, inneholder mange kjemiske komponenter og har mange interessante biologiske og farmakologiske aktiviteter.

Den overjordiske delen til salvie inneholder triterpenoider, diterpenoider, flavonoider og flyktige komponenter som monoterpenoider. I røttene er det hovedsakelig diterpenoider.

Oleanolsyre og ursolsyre er triterpenoider funnet i bladekstrakt av salvie. Disse forbindelsene er antatt å være viktige for den antiinflammatoriske aktiviteten til salvieekstrakt. Fenoliske diterpenoider som carnosol, carnosinsyre og fenoliske syrer som rosmarinsyre og kaffesyre har vist å være potente antioksidanter, og det er mye som tyder på at disse forbindelsene er ansvarlige for antioksidantaktiviteten til salvie. Carnosol, carnosinsyre og rosmarinsyre har også vist antiinflammatorisk aktivitet. Carnosol og carnosinsyre har dessuten vist antihyperlipidemi aktivitet hos mus.

Den eteriske oljen til salvie inneholder i overkant av 60 forskjellige komponenter, og sammensetningen kan variere mye blant annet etter vekstforhold, plantedeler og tid for innhøsting. Hovedkomponentene i den eteriske oljen er α - og β -thujon, kamfer, 1,8-cineol, β -pinen og karyofyllen. Den eteriske oljen til salvie har vist god antibakteriell aktivitet, men hovedsakelig mot grampositive bakterier. Det er antatt at den antibakterielle aktiviteten skyldes hele den eteriske oljen og at komponentene i oljen muligens kan virke synergistiske.

Den eteriske oljen til salvie og salvieekstrakt har vist anticholinesterase aktivitet, som sammen med antioksidant- og antiinflammatorisk aktivitet er antatt å være relevante i behandling av Alzheimers sykdom. Pasienter med mild til moderat Alzheimers sykdom som fikk salvieekstrakt viste statistisk signifikant bedring av kognitive funksjoner etter 4 måneder, i en dobbeltblind, randomisert og placebo-kontrollert studie.

Salvieekstrakt har dessuten vist hepatoprotektiv aktivitet, men sammen med karbontetraklorid ble det observert hepatotoksisitet. Det er antatt at salvieekstrakt og legemidler som metaboliseres av fase 1-enzymen kan interagere med hverandre og dermed påvirke virkningen og sikkerheten.

Den eteriske oljen til salvie har vist antimutagen aktivitet hos mutante prokaryote og eukaryote celler induisert av UV-stråling, og er derfor antatt å være relevant i kjemoprevensjon.

Salvieekstrakt har vist hypoglykemisk aktivitet hos rotter som ble gjort diabetiske. Andre aktiviteter som antiprotease, antispasme, antihypertensiv, angstløsende, hypnotisk og immunomodulerende har også blitt rapportert for salvie.

En del studier har vist muligheten til å produsere fenoliske antioksidanter fra salvie ved hjelp av *in vitro* kulturer, og at eksogene faktorer lett kan kontrolleres.

Toksisitet ved inntak av salvie har blitt rapportert, og antas å skyldes det høye innholdet av kamfer og α -thujon. Dessuten er det rapportert at α -thujon kan stimulere uterus og fremkalle abort.

Litteraturliste

Abdalla, A. E. og Roozen, J. P. (2001). The effects of stabilised extracts of sage and oregano on the oxidation of salads dressings. *European Food Research and Technology* **212**: 551-560.

Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H. og Khani, M. (2003). *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* **28**: 53-59.

Alarcon-Aguilar, F. J., Roman-Ramos, R., Flores-Saenz, J. L. og Aguirre-Garcia, F. (2002). Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and Alloxan-diabetic mice. *Phytotherapy Research* **16**: 383-386.

Amin, A. og Hamza, A. A. (2005). Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. *Life Sciences* **77**: 266-278.

Anonym. (2007). Felleskatalogen. <http://www.felleskatalogen.no/> 18.07.07.

Anonym. (u.å). Infojardin. <http://www.infojardin.com/fichas/condimentos/salvia-officinalis-salima-fina-hierba-sagrada-salvia-comun.htm> 31.07.07.

Aruoma, O. I. (1994). Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* **32**: 671-683.

Bandoniene, D., Gruzdiene, D. og Venskutonis, P. R. (2001). Antioxidant activity of sage extracts in rapeseed oil irradiated with UV-rays. *Nahrung/Food* **45**: 105-108.

Bandoniene, D., Venskutonis, P. R., Gruzdiene, D. og Murkovic, M. (2002). Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**: 286-292.

Baricevic, D. og Bartol, T. (2000). The Biological/Pharmacological Activity of The *Salvia* Genus. Sage, The Genus *Salvia*. S. E. Kintzios. Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 143-184.

Baricevic, D., Sosa, S., Della Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A. og Zupancic, A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: the relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **75**: 125-132.

Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K., Lu, Y. og Foo, L. Y. (2004). Antioxidant Mechanisms of Polyphenolic Caffeic Acid Oligomers, Constituents of *Salvia officinalis*. *Biological Research* **37**: 301-311.

Brieskorn, C. og Dömling, H. J. (1969). Carnosic acid as an antioxidant in rosemary and sage leaves. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* **141**: 10-16.

- Calucci, L., Pinzino, C., Zandomeneghi, M., Capocchi, A., Ghiringhelli, S., Saviozzi, F., Tozzi, S. og Galleschi, L. (2003). Effects of gamma-Irradiation on the Free Radical and Antioxidant Contents in Nine Aromatic Herbs and Spices. *Journal of agricultural and Food Chemistry* **51**: 927-934.
- Capek, P. og Hribalova, V. (2004). Water-soluble polysaccharides from *Salvia officinalis* L. possessing immunomodulatory activity. *Phytochemistry* **65**: 1983-1992.
- Capek, P., Hribalova, V., Svandova, E., Ebringerova, A., Sasinkova, V. og Masarova, J. (2003). Characterization of immunomodulatory polysaccharides from *Salvia officinalis* L. *International Journal of Biological Macromolecules* **33**: 113-119.
- Choi, H. R., Choi, J. S., Han, Y. N., Bae, S. J. og Chung, H. Y. (2002). Peroxynitrite Scavenging Activity of Herb Extracts. *Phytotherapy Research* **16**: 364-367.
- Cuvelier, M. E., Berset, C. og Richard, H. (1994). Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**: 665-669.
- Cuvelier, M. E., Richard, H. og Berset, C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **73**: 645-652.
- Dai, P. X., Chen, L. og Lan, S. S. (1989). Anti-inflammatory effect of oleanolic acid. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology* **3**: 96-99.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T. A. og Linssen, J. P. (1998). Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures from some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *Journal of Science, Food and Agriculture* **77**: 140-146.
- Dorman, H. J. D., Peltoketo, A., Hiltunen, R. og Tikkanen, M. J. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of deodourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *Food Chemistry* **83**: 255-262.
- Dragland, S., Senoo, H., Wake, K., Holte, K. og Blomhoff, R. (2003). Several Culinary and Medicinal Herbs Are Important Sources of Dietary Antioxidants. *The Journal of Nutrition* **133**: 1286-1290.
- Durling, N. E., Catchpole, O. J., Grey, J. B., Webby, R. F., Mitchell, K. A., Foo, L. Y. og Perry, N. B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry* **101**: 1417-1424.
- Dweck, A. C. (2000). The folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. Sage, The Genus *Salvia*. S. E. Kintzios. Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 1-25.
- Ebringerova, A., Kardosova, A., Hromadkova, Z. og Hribalova, V. (2003). Mitogenic and comitogenic activities of polysaccharides from some European herbaceous plants. *Fitoterapia* **74**: 52-61.

Eidi, M., Eidi, A. og Zamanizadeh, H. (2005). Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **100**: 310-313.

Elisabetsky, E., Marschner, J. og Souza, D. O. (1995). Effects of Linalool on Glutamatergic System in the Rat Cerebral Cortex. *Neurochemical Research* **20**: 461-465.

Emery, D. P. og Corban, J. G. (1999). Camphor toxicity. *Journal of Paediatrics and Child Health* **35**: 105-106.

Estévez, M., Ramírez, R., Ventanas, S. og Cava, R. (2007). Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid reactions in liver pâté. *Food Science and Technology* **40**: 58-65.

Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R. og Prior, E. (1996). Antioxidant Activity of a Rosemary Extract and Its Constituents, Carnosic Acid, Carnosol, and Rosmarinic Acid, in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 131-135.

Giannouli, A. L. og Kintzios, S. E. (2000). Essential Oils of *Salvia* spp.: Examples of Intraspecific and Seasonal Variation Sage, The Genus *Salvia*. S. E. Kintzios. Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 69-75.

Grzegorzczuk, I., Matkowski, A. og Wysokińska, H. (2007). Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry* **104**: 536-541.

Gupta, M. B., Bhalla, T. N., Gupta, G. P., Mitra, C. R. og Bhargava, K. P. (1969). Antiinflammatory activity of natural products (I) Triterpenoids. *European Journal of Pharmacology* **6**: 67-70.

Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition* **16**: 33-50.

Haraguchi, H., Saito, K., Okamura, N. og Yagi, A. (1995). Inhibition of Lipid Peroxidation and Superoxide Generation by Diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Medica* **61**: 333-336.

Haumann, B. F. (1990). Antioxidants: Firms seeking products they can label as 'natural'. *Inform.* **1**: 1002-1009.

Hjelmstad, R. (2006). Salvie. http://www.rolv.no/urtemedisin/medisinplanter/salv_off.htm 01.07.07.

Hohman, J., Zupkó, I., Rédei, D., Csányi, M., Falkay, G., Máthé, I. og Janicsák, G. (1999). Protective Effects of the Aerial Parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their Constituents against Enzyme-Dependent and Enzyme-Independent Lipid Peroxidation. *Planta Medica* **65**: 576-578.

Hold, K. M., Sirisoma, N. S., Ikeda, T., Narahashi, T. og Casida, J. E. (2000). α -Thujone (the active component of absinthe): γ -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 3826-3831.

Horiuchi, K., Shiota, S., Kuroda, T., Hatano, T., Yoshida, T. og Tsuchiya, T. (2007). Potentiation of Antimicrobial Activity of Aminoglycosides by Carnosol from *Salvia officinalis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **30**: 287-290.

Huang, M.-T., Ho, C.-T., Wang, Z. Y., Ferraro, T., Lou, Y.-R., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J. D. og Conney, A. H. (1994). Inhibition of Skin Tumorigenesis by Rosemary and Its Constituents Carnosol and Ursolic Acid. *Cancer Research* **54**: 701-708.

Iuvone, T., De Filippis, D., Esposito, G., D'Amico, A. og Izzo, A. A. (2006). The Spice Sage and Its Active Ingredient Rosmarinic Acid Protect PC12 Cells from Amyloid-beta Peptide-Induced Neurotoxicity. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics* **317**: 1143-1149.

Jedinák, A., Muckova, M., Kost'alova, D., Maliar, T. og Masterova, I. (2006). Antiprotease and Antimetastatic Activity of Ursolic acid Isolated from *Salvia officinalis*. *Zeitschrift für Naturforschung* **61c**: 777-782.

Jie, L. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **49**: 57-68.

Kavvadias, D., Monschein, V., Sand, P., Riederer, P. og P., S. (2003). Constituents of sage (*Salvia officinalis*) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor. *Planta Medica* **63**: 113-117.

Kennedy, D. O. og Scholey, A. B. (2005). Sage and brain function. *Nutrition Abstracts and Reviews. Series A, Human and Experimental* **75**: 25N-31N.

Kennedy, D. O. og Scholey, A. B. (2006). The Psychopharmacology of European Herbs with Cognition-Enhancing Properties. *Current Pharmaceutical Design* **12**: 4613-4623.

Kintzios, S.E., red. (2000). Sage - the Genus *Salvia*. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.

Kuhlmann, A. og Röhl, C. (2006). Phenolic Antioxidant Compounds Produced by *in Vitro* Cultures of Rosemary (*Romarinus officinalis*) And Their Anti-inflammatory Effect on Lipopolysaccharide-Activated Microglia. *Pharmaceutical Biology* **44**: 401-410.

Lamaison, J. L., Petitjean-Freytet, C. og Carnat, A. (1991). Lamiacées médicinales à propriétés antioxydantes, sources potentielles d'acide rosmarinique. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **66**: 185-188.

Lea, T. (2002). Immunologi og immunologiske teknikker. Bergen, Fagforlaget.

Lima, C. F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M. og Pereira-Wilson, C. (2005). The drinking of a *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology* **97**: 383-389.

Lima, C. F., Fernandes-Ferreira, M. og Pereira-Wilson, C. (2007a). Drinking of *Salvia officinalis* tea increases CCl₄-induced hepatotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology* **45**: 456-464.

Lima, C. F., Valentao, P. C. R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M. og Pereira-Wilson, C. (2007b). Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions* **167**: 107-115.

Lindsay, D. G. og Astley, S. B. (2002). European research on the functional effects of dietary antioxidants - EUROFEDA. *Molecular Aspects of Medicine* **23**: 1-38.

Lo, A.-H., Liang, Y.-C., Lin-Shiau, S.-Y., Ho, C.-T. og Lin, J.-K. (2002). Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis* **23**: 983-991.

Longaray Delamare, A. P., Moschen-Pistorello, I. T., Artico, L., Atti-Serafini, L. og Echeverrigaray, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry* **100**: 603-608.

Love, J. N., Sammon, M. og Smereck, J. (2004). Are one or two dangerous? camphor exposure in toddlers. *Journal of Emergency Medicine* **27**: 49-54.

Lu, Y. og Foo, L. Y. (1999a). Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* **51**: 91-94.

Lu, Y. og Foo, L. Y. (2000). Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* **55**: 263-267.

Lu, Y. og Foo, L. Y. (2001a). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* **75**: 197-202.

Lu, Y. og Foo, L. Y. (2001b). Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Letters* **42**: 8223-8225.

Lu, Y., Foo, L. Y. og Wong, H. (1999b). Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* **52**: 1149-1152.

Luis, J. G., Lahlou, E. H., Andres, L. S., Sood, G. H. N. og Ripo, M. M. (1996). Apiananes: C₂₃ Terpenoids with a New Type of Skeleton from *Salvia apiana*. *Tetrahedron Letters* **37**: 4213-4216.

Mahato, S. B., Sarkar, S. K. og Poddar, G. (1988). Triterpenoid saponins. *Phytochemistry* **27**: 3037-3067.

- Meltzer, M. og Malterud, K. E. (1997). Can dietary flavonoids influence the development of coronary heart disease? *Scandinavian Journal of Nutrition/ Näringsforskning* **41**: 50-57.
- Miski, M., Ulubelen, A., Johansson, C. og Mabry, T. J. (1983). Antibacterial Activity Studies of Flavonoids From *Salvia palaestina*. *Journal of Natural Products* **46**: 874-875.
- Miura, K., Kikuzaki, H. og Nakatani, N. (2001). Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* **58**: 1171-1175.
- Miura, K., Kikuzaki, H. og Nakatani, N. (2002). Antioxidant activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Measured by the Oil Stability Index Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 1845-1851.
- Munne-Bosch, S. og Alegre, L. (2003). Drought-Induced Changes in the Redox State of alpha-Tocopherol, Ascorbate, and the Diterpene Carnosic Acid in Chloroplasts of Labiatae Species Differing in Carnosic Acid Contents. *Plant Physiology* **131**: 1816-1825.
- Munne-Bosch, S., Mueller, M., Schwarz, K. og Alegre, L. (2001). Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. *Journal of Plant Physiology* **158**: 1431-1437.
- Newall, C. A., Anderson, L. A. og Philipson, J. D. (1996). A guide for Health-Care Professionals. London. Pharmaceutical Press.
- Nikolova, M. T., Grayer, R. J., Genova, E. og Porter, E. A. (2006). Exudate flavonoids from Bulgarian species of *Salvia*. *Biochemical Systematics and Ecology* **34**: 360 - 364.
- Ninfali, P., Mea, G., Giorgini, G., Bacchiocca, M. og Rocchi, M. (2005). Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. *British Journal of Nutrition* **93**: 257-266.
- Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawa, T. og Yoshikawa, M. (2004). Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **14**: 1943-1946.
- Omar, S. S., Al-Delaimy, K. S. og Abdullah, Z. A. (2006). The Inhibitory Effect of Jordanian Selected Plant Extracts on Growth and Enterotoxin Production by *Clostridium perfringens*. *Advances in Food Sciences* **28**: 23-38.
- Paulsen, B. S. og Barsett, H. (2005). Bioactive Pectic Polysaccharides. *Polysaccharides I*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag. **186**: 69-101.
- Pearson, D. A., Frankel, E. N., Aeschbach, R. og German, J. B. (1997). Inhibition of Endothelial Cell-Mediated Oxidation of Low-Density Lipoprotein by Rosemary and Plant Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 578-582.
- Perry, E., Pickering, A., Wang, W. W., Houghton, P. J. og Perry, N. (1999). Medicinal Plants and Alzheimer's Disease: from Ethnobotany to Phytotherapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **51**: 527-534.

Perry, N., Court, G., Bidet, N., Court, J. og Perry, E. (1996). European herbs with cholinergic activities: Potential in dementia therapy. *International Journal of Geriatric Psychiatry* **11**: 1063-1069.

Perry, N., Howes, M.-J., Houghton, P. J. og Perry, E. (2000b). Why sage may be a wise remedy: effects of *Salvia* on the nervous system. Sage, The Genus *Salvia*. S. E. Kintzios. Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 201-224.

Perry, N. B., Anderson, R. E., Brennan, N. J., Douglas, M. H., Heaney, A. J., McGimpsey, J. A. og Smallfield, B. M. (1999). Essential Oils from Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among Individuals, Plant Parts, Seasons, and Sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 2048-2054.

Perry, N. B., Baxter, A. J., N.J., B., Klink, J. v., McGimpsey, J. A., Douglas, M. H. og Joulain, D. (1996). Dalmatian Sage. Part 1. Differing Oil Yields and Compositions from Flowering and Non-Flowering Accessions. *Flavour and Fragrance Journal* **11**: 231-238.

Puleo, M. A. (1978). Ethnobotany, Pharmacology, and Chemistry of Thujone-Containing Plants and Derivatives. *Economic Botany* **32**: 65-74.

Rau, O., Wurglics, M., Paulke, A., Zitzkowski, J., Meindl, N., Bock, A., Dingermaier, T., Abdel-Tawab, M. og Schubert-Zsilavecz, M. (2006). Carnosic acid and carnosol, phenolic diterpene compounds of the labiate herbs rosemary and sage, are activators of the human peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Planta Medica* **72**: 881-887.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. og Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* **20**: 933-956.

Santos-Gomes, P. C. og Fernandes-Ferreira, M. (2001). Organ- and Season-Dependent Variation in the Essential Oil Composition of *Salvia officinalis* L. Cultivated at Two Different Sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**: 2908-2916.

Santos-Gomes, P. C., Seabra, R. M., Andrade, P. B. og Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science* **162**: 981-987.

Savelev, S., Okello, E. og Perry, E. (2004). Butyryl- and Acetyl-cholinesterase Inhibitory Activities in Essential Oils of *Salvia* Species and Their Constituents. *Phytotherapy Research* **18**: 315-324.

Savelev, S., Okello, E., Perry, N. S. L., Wilkins, R. M. og Perry, E. K. (2003). Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **75**: 661-668.

Sekretár, S., Schmidt, S., Vajdák, M., Zahradníková, L. og Annus, J. (2004). Antioxidative and antimicrobial effects of some natural extracts in Lard. *Czech Journal of Food Sciences* **22**: 215-218.

Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. og Corke, H. (2005). Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 7749-7759.

Singh, G. B., Singh, S., Bani, S., Gupta, B. D. og Banerjee, S. K. (1992). Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **44**: 456-458.

Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T. og Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, Cytotoxic, and Antiviral Activities of *Salvia fruticosa* Essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 3197-3201.

Stahl, V. og Sies, H. (1997). Antioxidant defense: Vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* **46**: S14-S18.

Tanaka, Y., Kikuzaki, H. og Nakatani, N. (2002). Antibacterial Activity of Essential Oils and Oleoresins of Spices and Herbs against Pathogens Bacteria in Upper Airway Respiratory Tract. *Nippon Shaguhin Kagaku Gakkaishi* **92**: 67-76.

Ternes, W. og Schwarz, K. (1995). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* **201**: 548-550.

Todorov, S., Philianos, S., Petkov, V., Harvala, C., Zamfirova, R. og Olimpiou, H. (1984). Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. *Acta Physiologica et Pharmacologica Bulgaria* **10**: 13-20.

Trojakova, L., Reblova, Z., Nguyen, H. T. T. og Pokorny, J. (2001). Antioxidant activity of rosemary and sage extrats in rapeseed oil. *Journal of Food Lipids* **8**: 1-13.

Ulubelen, A. (2000). Chemical constituents: Terpenoids in The Genus *Salvia*. Sage, The Genus *Salvia*. S. E. Kintzios. Amsterdam, Harwood Academic Publishers: 55-68.

Velickovic, A. S., Ristic, M. S., Velickovic, D. T., Ilic, S. N. og Mitic, N. D. (2003b). The possibilities of the application of some species of sage (*Salvia* L.) as auxiliaries in the treatment of some diseases. *Journal of the Serbian Chemical Society* **68**: 435-445.

Velickovic, D. T., Randjelovic, N. V., Ristic, M. S., Velickovic, A. S. og Smelcerovic, A. A. (2003a). Chemical constituents and antimicrobial activity of the ethanol extracts obtained from the flower, leaf and stem of *Salvia officinalis* L. *Journal of the Serbian Chemical Society* **68**: 17-24.

Vukovic-Gacic, B., Nikcevic, S., Beric-Bjedov, T., Knezevic-Vukcevic, J. og Simic, D. (2006). Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chemical Toxicology* **44**: 1730-1738.

Wang, M., Kikuzaki, H., Zhu, N., Sang, S., Nakatani, N. og Ho, C. T. (2000). Isolation and Structural Elucidation of Two New Glycosides from Sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 235-238.

Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., LaVoie, E. J., Huang, T. C. og Ho, C. T. (1998). Antioxidative Phenolic Compounds from Sage (*Salvia officinalis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry **46**: 4869-4873.

Wang, M., Shao, Y., Li, J., Zhu, N., Rangarajan, M., LaVoie, E. J. og Ho, C. T. (1999). Antioxidative Phenolic Glycosides from Sage (*Salvia officinalis*). Journal of Natural Products **62**: 454-456.

Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K. og Schempp, C. M. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. Phytomedicine **14**: 508-516.

Yanishlieva, N. E., Marinova, E. og Pokorný, J. (2006). Natural antioxidants from herbs and spices. European Journal of Lipid Science and Technology **108**: 776-793.

Zupkó, I., Hohman, J., Rédei, D., Falkay, G., Janicsák, G. og Máthé, I. (2001). Antioxidant Activity of Leaves of *Salvia* Species in Enzyme-Dependent and Enzyme-Independent Systems of Lipid Peroxidation and their Phenolic Constituents. Planta Medica **67**: 366-368.

Østerud, B. (u.å). Urter i litteraturen. <http://www.aa-arkivet.no/Urter/salvie.htm> 20.05.07.

Özcan, M. (2003). Antioxidant Activities of Rosemary, Sage, and Sumac Extracts and Their Combinations on Stability of Natural Peanut Oil. Journal of Medicinal Food **6**: 267-270.